

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



**TESIS DOCTORAL**

**Regulación de sistema ubiquitina-proteasoma por los receptores  
purinérgicos en el sistema nervioso central**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Laura de Diego García**

Director

**Miguel Díaz Hernández**

**Madrid, 2018**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Veterinaria**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV**



**Regulación del Sistema Ubiquitina-Proteasoma por los  
receptores purinérgicos en el Sistema Nervioso Central**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

**D<sup>a</sup>. Laura de Diego García**

Bajo la dirección del doctor:

**D. Miguel Díaz Hernández**

**Madrid, 2017**



La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a una beca predoctoral de Personal Investigador en Formación de la Universidad Complutense de Madrid. Asimismo, ha sido financiada con el Proyecto de Investigación BFU2012-31195 del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

El **Dr. D. Miguel Díaz Hernández**, profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

**CERTIFICA:**

Que **D<sup>a</sup>. Laura de Diego García**, Diplomada y Máster en Óptica, Optometría y Visión por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado *“Regulación del Sistema Ubiquitina-Proteasoma por los receptores purinérgicos en el Sistema Nervioso Central”* como Tesis Doctoral cumpliendo las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Marzo de 2017

Vº Bº DIRECTOR

Dr. Miguel Díaz Hernández

Profesor Titular de Universidad

<b>A<math>\beta</math></b>	Péptido $\beta$ -amiloide
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ADAM</b>	Desintegrina y Metaloproteinasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADP</b>	Adenosina-5'-difosfato
<b>AMC</b>	Metilcumarina
<b>AMP</b>	Adenosina-5'-monofosfato
<b>AMPC</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	P <sup>1</sup> ,P <sup>4</sup> -Di( adenosina-5')tetrafosfato
<b>APP</b>	Proteína Precursora de amiloide
<b>APPh</b>	Proteína Precursora de amiloide humana
<b>APS</b>	Persulfato amónico
<b>AraC</b>	$\beta$ -D-arabinofuranósido
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ATP</b>	Adenosina-5'-trifosfato
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>BOC</b>	BOC-LSTR-AMC
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa tipo 2
<b>CT-L</b>	Actividad catalítica del proteasoma tipo Quimotripsina- <i>like</i>
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DIV</b>	Días <i>in vitro</i>
<b>DMEM</b>	Del inglés: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DUB</b>	Enzimas desubiquitilantes
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EBSS</b>	Del inglés: <i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo

<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino tetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor de EGF
<b>EGTA</b>	Ácido etilen-bis(oxinitrilo)-tetraacético
<b>ERKs</b>	Quinasas reguladas por señalización extracelular
<b>FBS</b>	Suero Fetal bovino
<b>FBSi</b>	Suero Fetal bovino inactivado
<b>FK2</b>	Anticuerpo frente a proteínas mono- y poliUbiquitinadas
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GD</b>	Giro dentado
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar ácida
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GFP-CL1</b>	Molécula reportera del UPS tipo degrón
<b>Glutamax™</b>	L-alanil-L-glutamina
<b>GPRC</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HRP</b>	Del inglés: <i>Horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano
<b>Iba-1</b>	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración de inhibidor que produce el 50% del efecto máximo
<b>i.c.v</b>	Inyección intracerebroventricular
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IFN-γ</b>	Interferón-γ
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>INS365</b>	Up <sub>4</sub> U; P <sup>1</sup> ,P <sup>4</sup> -Di(uridina-5')-tetrafosfato; Diquafosol
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5-trifosfato
<b>J20</b>	Ratón transgénico modelo de la enfermedad de Alzheimer
<b>J20/U1</b>	Ratón transgénico modelo de la enfermedad de Alzheimer y reportero del UPS
<b>LMP2</b>	Del inglés: <i>Low Molecular-mass polypeptide-2</i> ; Polipéptidos de Baja Masa Molecular-2
<b>LMP7</b>	Del inglés: <i>Low Molecular-mass polypeptide-7</i> ; Polipéptidos de Baja Masa Molecular-7
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido, endotoxina
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>MECL-1</b>	Del inglés: <i>Multicatalytic Endopeptidase Complex-like 1</i> ; Complejo-like endopeptidasa multicatalítico-1
<b>MG132</b>	Carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-leucinal

<b>MHC-I</b>	Complejo Mayor de histocompatibilidad de tipo I
<b>M-MLV</b>	Enzima transcriptasa inversa del virus de leucemia murina
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolio
<b>N2a</b>	Células de neuroblastoma de ratón 2a
<b>NAP</b>	Z-LLE-β-2-naftilamina
<b>NB</b>	Medio de cultivo neurobasal
<b>NeuN</b>	Marcador de núcleos neuronales
<b>NF-κB</b>	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas
<b>NP40</b>	Nonidet-P40
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>P1</b>	Receptores purinérgicos de nucleósidos
<b>P2</b>	Receptores purinérgicos de nucleótidos
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDGFR</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PFA</b>	paraformaldehído
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PG-L</b>	Actividad catalítica del proteasoma tipo caspasa-like
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-quinasa
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A (dependiente de AMPc)
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C (dependiente de Ca <sup>2+</sup> /fosfolípidos)
<b>PLA<sub>2c</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> citosólica
<b>PLA</b>	Fosfolipasa A
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PoliUb</b>	PoliUbiquitinación
<b>PSI</b>	Del inglés: <i>Proteasome Inhibitor I</i>
<b>psLUC</b>	Plásmido contra el ADN codificante de la luciferasa de luciérnaga
<b>Pyk2</b>	Tirosina quinasa rica en prolina 2
<b>Q-PCR</b>	PCR cuantitativa
<b>RB2</b>	Del inglés: <i>Reactive Blue 2</i> , Reactivo Azul 2
<b>RGD</b>	Dominio Arg-Gly-Asp
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto

<b>Rpn</b>	Subunidades del proteasoma con actividad no-ATPasa
<b>Rpt</b>	Subunidades del proteasoma con actividad ATPasa
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>s.e.m</b>	Error estándar de la media
<b>Ser</b>	Serina
<b>SH3</b>	Dominios de homología Src 3
<b>ShRNA</b>	Del inglés: <i>small hairpin RNA</i> , ARN de interferencia
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>Src</b>	Proteína quinasa del retrovirus del sarcoma de Rous
<b>STS</b>	Estaurosporina
<b>SUCC</b>	SUCC-LLVY-AMC
<b>TBS</b>	Tampón Tris salino
<b>TEM</b>	Del inglés: Transendothelial migration, Migración transendotelial
<b>Temed</b>	Tetrametiletilenodiamina
<b>Thr</b>	Treonina
<b>T-L</b>	Actividad catalítica del proteasoma tipo Tripsina- <i>like</i>
<b>TLR</b>	Receptores de tipo <i>Toll-like</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)-aminometano
<b>TRPV1</b>	Receptores de vaniloides tipo 1
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>U1</b>	Ratón transgénico reportero de la actividad del UPS (línea 1)
<b>U.A</b>	Unidades arbitrarias de absorbancia o fluorescencia
<b>Ub</b>	Ubiquitina
<b>Ub<sup>G76V</sup>-YFP</b>	Molécula reportera del UPS tipo UFD
<b>Ub-M-GFP</b>	Molécula reportera del UPS tipo UFD
<b>UDP</b>	Uridina-5'- difosfato
<b>UFD</b>	Del inglés: <i>Ubiquitin Fusion Degradation</i>
<b>UMP</b>	Uridina monofosfato
<b>Up<sub>4</sub>U</b>	P <sup>1</sup> ,P <sup>4</sup> -Di(uridina-5')-tetrafosfato; Diquafosol, INS365
<b>UPS</b>	Del inglés: <i>Ubiquitin Proteasome System</i> ; Sistema Ubiquitina Proteasoma
<b>UTP</b>	Uridina-5'-trifosfato
<b>VNUT</b>	Transportador vesicular de nucleótidos

<b>WB</b>	Del inglés: <i>Western Blot</i> ; Inmunotransferencia
<b>WT</b>	Del inglés: <i>Wild Type</i> ; ratón silvestre
<b>YFP</b>	Del inglés: <i>Yellow Fluorescent Protein</i> ; Proteína amarilla fluorescente

## ABREVIATURAS

RESUMEN .....	1
---------------	---

SUMMARY .....	7
---------------	---

I. INTRODUCCIÓN .....	13
-----------------------	----

1. SISTEMA PURINÉRGICO .....	13
1.1. Los nucleótidos en la neurotransmisión .....	13
1.2. Almacenamiento y liberación de nucleótidos .....	14
1.3. Degradación de nucleótidos .....	15
1.4. Receptores de nucleósidos .....	17
1.5. Receptores de nucleótidos .....	18
1.5.1. Receptores ionotrópicos P2X .....	19
1.5.2. Receptores metabotrópicos P2Y .....	22
1.5.3. Receptor metabotrópico P2Y <sub>2</sub> .....	26
1.5.3.1. Características farmacológicas del receptor P2Y <sub>2</sub> .....	27
1.5.3.2. Características estructurales y señalización intracelular mediada por el receptor P2Y <sub>2</sub> .....	28
1.5.3.3. Implicación del receptor P2Y <sub>2</sub> en procesos de neuroinflamación y neuroprotección .....	31
2. EL SISTEMA UBIQUITINA-PROTESOMA .....	34
2.1. Implicación de UPS en situaciones patológicas .....	38

II. OBJETIVOS .....	45
---------------------	----

III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
---------------------------------	----

1. MATERIALES .....	49
1.1 Instrumentación .....	49
1.2 Reactivos y productos químicos .....	49
1.3 Herramientas farmacológicas .....	50
1.4 Anticuerpos .....	51
1.5 Oligonucleótidos .....	52
1.6 Material biológico .....	53
1.6.1 Muestras humanas .....	53
1.6.2 Modelos animales .....	53
1.6.2.1 Ratón reportero de la actividad del UPS (ratón Ub <sup>G76V</sup> -GFP) .....	54
1.6.2.2 Ratón transgénico carente de la proteína P2Y <sub>2</sub> .....	55



1.6.2.3	Ratón doble transgénico carente de la proteína P2Y <sub>2</sub> con expresión del reportero de la actividad del UPS .....	55
1.6.2.4	Ratón transgénico modelo de la enfermedad de Alzheimer (J20).....	57
1.6.2.5	Ratón doble transgénico modelo de la enfermedad de Alzheimer con expresión del reportero de la actividad del UPS.....	57
1.6.3	Modelos celulares .....	57
1.6.3.1	Aislamiento y cultivo de neuronas de hipocampo.....	57
1.6.3.2	Aislamiento y cultivo de células gliales hipocámpales.....	60
1.6.3.3	Cultivo de líneas celulares de neuroblastoma mûrido (N2a) .....	60
2.	MÉTODOS.....	61
2.1	Transfecciones celulares .....	61
2.2.	Administración de fármacos en cultivos celulares .....	63
2.3.	Inyección intracerebroventricular .....	64
2.4.	Experimentos de comportamiento: test de interacción social .....	66
2.5.	Obtención y manipulación de ácidos nucleicos .....	67
2.5.1.	Genotipado de las diferentes líneas transgénicas .....	67
2.5.2.	Extracción y cuantificación de ARN total .....	68
2.5.3.	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	68
2.5.4.	PCR cuantitativa a tiempo real (q-PCR) .....	69
2.6.	Inmunotransferencia o <i>Western Blot</i> .....	70
2.7.	Ensayo de viabilidad celular basado en el metabolismo del MTT .....	71
2.8.	Medida de la actividad enzimática del proteasoma .....	72
2.9.	Técnicas histológicas .....	74
2.9.1.	Procesamiento del tejido .....	74
2.9.2.	Inmunofluorescencia de secciones de cerebro.....	74
2.10.	Análisis estadístico de los datos .....	75
IV.	<b>RESULTADOS</b> .....	79
1.	APROXIMACIÓN FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i> PARA DETERMINAR SI LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS METABOTRÓPICOS PUEDEN MODULAR LA ACTIVIDAD DEL UPS.....	79
2.	EL DINUCLEÓTIDO Up <sub>4</sub> U PRODUCE UN INCREMENTO EN LA ACTIVIDAD DEL UPS.....	82

3. EL EFECTO MODULADOR QUE EJERCE EL $U_{p4U}$ SOBRE LA ACTIVIDAD DEL UPS ES DEBIDO A LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR $P2Y_2$ .....	86
4. LA ACTIVACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL RECEPTOR $P2Y_2$ MODULA LAS ACTIVIDADES CATALÍTICAS DEL PROTEASOMA Y LA EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\beta$ CONSTITUTIVAS.....	89
5. LAS QUINASAS MEK1/2 Y PI3K SE ENCUENTRAN IMPLICADAS EN EL EFECTO MODULADOR QUE EL RECEPTOR $P2Y_2$ EJERCE SOBRE EL UPS.....	91
6. LA ACTIVACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL RECEPTOR $P2Y_2$ PRODUCE UN AUMENTO DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DEL UPS Y DE LA EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\beta$ CONSTITUTIVAS.....	94
7. LA NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS ALTERA EL CORRECTO FUNCIONAMIENTO DEL UPS.....	95
8. LA ADMINISTRACIÓN DE LPS PRODUCE UN AUMENTO DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR $P2Y_2$ .....	99
9. EL RECEPTOR $P2Y_2$ JUEGA UN PAPEL RELEVANTE EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR LPS.....	102
10. LOS RATONES CARENTES DEL RECEPTOR $P2Y_2$ TRATADOS CON LPS MUESTRAN UNA MAYOR INTERACCIÓN SOCIAL.....	105
11. LPS Y SURAMINA COMPARTEN EL MISMO MECANISMO MOLECULAR PARA MODIFICAR LA ACTIVIDAD DEL UPS.....	106
12. LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR $P2Y_2$ CONSIGUE MODULAR EL DESEQUILIBRIO DE LA PROTEOSTASIS CELULAR PRODUCIDO POR LA ADMINISTRACIÓN DE LPS.....	107
13. LAS QUINASAS SRC Y PI3K SE ENCUENTRAN IMPLICADAS EN EL EFECTO MODULADOR QUE EL RECEPTOR $P2Y_2$ EJERCE SOBRE LA ACTIVIDAD DEL UPS <i>IN VIVO</i> .....	112
14. DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER SE PRODUCE UNA CORRELACIÓN ENTRE LA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL UPS Y LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR $P2Y_2$ .....	117
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>123</b>
1. EFECTO MODULADOR DE LOS NUCLEÓTIDOS EXTRACELULARES SOBRE LA ACTIVIDAD DEL UPS.....	123

2.	EL RECEPTOR P2Y <sub>2</sub> JUEGA UN PAPEL CLAVE EN LA ALTERACIÓN DE LA PROTEOSTASIS CELULAR INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE LPS.....	126
3.	IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR P2Y <sub>2</sub> EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	134
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>141</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>145</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXO I.....</b>	<b>167</b>

*RESUMEN*

---

Los nucleótidos, que se comportan como neurotransmisores en el SNC, se encuentran implicados en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos (Bodin & Burnstock 2001). Este papel como neurotransmisores se debe a que pueden activar diferentes receptores específicos de la membrana celular, denominados receptores purinérgicos P2 (Burnstock 2007). Estos receptores se dividen en dos grupos: receptores ionotrópicos (P2X1-7) y receptores metabotrópicos (P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub>) (Burnstock et al 2012). Los receptores metabotrópicos P2Y se expresan en los diferentes linajes celulares del SNC donde regulan una gran variedad de procesos fisiológicos como la proliferación, crecimiento o supervivencia celular (Khakh & Burnstock 2009). Dentro de los receptores P2Y, el receptor P2Y<sub>2</sub> posee unas características estructurales especiales que le permiten interactuar tanto con integrinas como con otros receptores, lo cual hace que esté implicado en numerosos fenómenos fisiológicos y patológicos (Weisman et al 2012). De hecho, se ha postulado que el receptor P2Y<sub>2</sub> representa una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de algunas enfermedades. El papel neuroprotector asociado a dicho receptor ha sido observado principalmente bajo condiciones de neuroinflamación, estrés oxidativo y en enfermedades neurodegenerativas (Weisman et al 2012). Normalmente, estas situaciones se encuentran asociadas a un aumento de la cantidad de proteínas mal plegadas en el interior celular, hecho relacionado a su vez con un mal funcionamiento del Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS) (Dantuma & Lindsten 2010). El UPS es el principal sistema encargado de controlar la proteostasis celular (Kaushik & Cuervo 2015), degradando de una manera específica y selectiva la mayoría de las proteínas intracelulares. Mediante la acción coordinada de las enzimas E1, E2 y E3, la proteína a degradar será marcada con una cadena de moléculas de Ubiquitina para posteriormente ser degradada por el proteasoma (Hershko & Ciechanover 1998). El hecho de que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> sea vital para mantener la supervivencia celular en condiciones de estrés oxidativo, condición bajo la cual se encuentra alterado el correcto funcionamiento del UPS (Ahmad et al 2004), nos hizo pensar que tal vez el papel neuroprotector asociado al receptor P2Y<sub>2</sub> fuera debido a su capacidad de regular, de alguna manera, la actividad del UPS.

Considerando estos antecedentes, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar si el receptor P2Y<sub>2</sub> es capaz de modular la actividad del UPS. Para alcanzar

este objetivo se utilizaron diversas herramientas farmacológicas y de Biología Molecular tanto en líneas celulares inmortalizadas, cultivos primarios de diferentes linajes celulares, así como en diferentes modelos murinos. Además, nos propusimos determinar si el receptor P2Y<sub>2</sub> estaba implicado en la alteración de la proteostasis celular inducida por diferentes estímulos proinflamatorios. Finalmente, se evaluó el posible papel terapéutico que el receptor P2Y<sub>2</sub> puede tener en las enfermedades neurodegenerativas, utilizando como modelo la enfermedad de Alzheimer.

Inicialmente, los estudios realizados en la línea celular N2a señalaban que el receptor P2Y<sub>2</sub> puede modular la actividad del UPS. De tal manera que, la estimulación de estas células con el agonista selectivo del receptor P2Y<sub>2</sub>, el Up<sub>4</sub>U, indujo un aumento de las actividades CT-L y PG-L como consecuencia de un incremento en la expresión de las subunidades  $\beta 5$  y  $\beta 1$ . La confirmación de que el receptor P2Y<sub>2</sub> puede modular la actividad del UPS se obtuvo al observar que el tratamiento de los ratones carentes del receptor P2Y<sub>2</sub> con el dinucleótido Up<sub>4</sub>U no indujo modificaciones ni en las actividades CT-L y PG-L ni en los niveles de las subunidades  $\beta 5$  y  $\beta 1$ , al contrario de lo observado en los ratones silvestres. Además, pudimos identificar que la ruta de señalización intracelular implicada en este fenómeno era la constituida por las quinasas Src/PI3K/MEK/ERK.

En un segundo paso, gracias al empleo de ratones transgénicos que expresan una proteína reportera del UPS, pudimos determinar cómo el receptor P2Y<sub>2</sub> juega un papel clave en la alteración de la proteostasis celular inducida por el estímulo proinflamatorio (LPS). Los resultados obtenidos en estos estudios sugieren que existe una estrecha relación entre el receptor de LPS (TLR4) y el receptor P2Y<sub>2</sub>, de tal manera que la activación del receptor TLR4 altera la proteostasis celular gracias a que induce una regulación negativa sobre el receptor P2Y<sub>2</sub>. De acuerdo con esta hipótesis, también observamos como la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> es capaz de devolver a la célula a su equilibrio proteostático alterado por la administración de LPS. Estos estudios también revelaron que los astrocitos son el linaje celular más susceptible a la alteración de la proteostasis inducida por la activación del receptor TLR4, así como a la regulación de dicha actividad por el receptor P2Y<sub>2</sub>.

Por último, es de destacar que también se observó una estrecha correlación entre la regulación que el receptor P2Y<sub>2</sub> ejerce sobre la proteostasis celular de las células astrogiales y la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

Como conclusión de esta Tesis Doctoral, podemos afirmar que nucleótidos extracelulares, a través del receptor P2Y<sub>2</sub>, son capaces de regular la actividad del UPS. De este modo, la activación de dicho receptor por el dinucleótido Up<sub>4</sub>U, produce un aumento significativo de la actividad del UPS. Además, este efecto modulador positivo es capaz de contrarrestar la alteración en el equilibrio proteostático inducida por estímulos proinflamatorios como es el LPS. Finalmente, también postulamos que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> puede ser una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer ya que podría equilibrar la proteostasis celular alterada y ralentizar así la progresión de la patología.

## *SUMMARY*

---



Nucleotides, which act as neurotransmitters in the Central Nervous System (CNS), are involved in several physiological and pathological processes (Burnstock 2007). This role as neurotransmitters is due to their capacity to activate different specific receptors in the cellular membrane denominated P2 purinergic receptors. These receptors are divided into two groups: ionotropic receptors (P2X1-7) and metabotropic receptors (P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub>) (Burnstock et al 2012). Metabotropic P2Y receptors are expressed in the different cellular lineages that form the CNS where they regulate a wide variety of physiological processes such as cell proliferation, growth or survival (Khakh & Burnstock 2009). Within P2Y receptors, the P2Y<sub>2</sub> receptor has special structural characteristics that allow it to interact with both integrins and others receptors, which are related to several physiological and pathological phenomenon (Weisman et al 2012). Hence, it has been described that under neuroinflammation conditions, oxidative stress and neurodegenerative disorders, P2Y<sub>2</sub> receptor may play a neuroprotective role (Weisman et al 2012). It is interesting to highlight that in the aforementioned pathological conditions an increase in the number of misfolded proteins in the intracellular content it is also produced, a fact that has been related to an impairment of the Ubiquitin-Proteasome System (UPS) (Dantuma & Lindsten 2010). The UPS is the main system responsible for controlling the cellular proteostasis (Kaushik & Cuervo 2015), degrading in a specific and selective manner the majority of intracellular proteins (Hershko & Ciechanover 1998). The fact that P2Y<sub>2</sub> activation is crucial for maintaining cellular survival under oxidative stress conditions where an impairment of the UPS it has also been observed (Ahmad et al 2004), made us think that perhaps, the neuroprotective role associated with the P2Y<sub>2</sub> receptor was due to its ability to regulate, in some way, the UPS activity.

Taking into account the aforementioned considerations, the aim of this Doctoral Thesis has been to evaluate if the P2Y<sub>2</sub> receptor is able to modulate the UPS activity. To achieve this objective, different experimental approaches were carried out including the employment of diverse pharmacological and molecular biology tools in both immortalized cell lines, primary cultures of different lineages, as well as in different murine models. In addition, we decided to study whether the P2Y<sub>2</sub> receptor may be playing a noteworthy event in the alteration of proteostasis that some cells undergo as a consequence of different proinflammatory stimulus. Based on the results obtained in

these studies, we could determine if the P2Y<sub>2</sub> receptor can be considered a good pharmacological target to combat certain neurodegenerative diseases whose progression has been associated with an alteration of the cellular proteostasis, as is the case of Alzheimer's disease.

Studies carried out in the N2a cell line seem to indicate that the P2Y<sub>2</sub> receptor is able to modulate the UPS activity. Thus, stimulation of these cells with the selective agonist of the P2Y<sub>2</sub> receptor, the dinucleotide Up<sub>4</sub>U, induced an increase in both CT-L and PG-L activity as a result of an increase in the expression of the  $\beta$ 5 and  $\beta$ 1 subunits. Confirmation that the P2Y<sub>2</sub> receptor can modulate the UPS activity was obtained by observing that treatment of mice lacking the P2Y<sub>2</sub> receptor with the compound Up<sub>4</sub>U did not induce modifications in either CT-L or PG-L activities or in the levels of the subunits expression  $\beta$ 5 and  $\beta$ 1, contrary to what was observed in Wild Type mice. Moreover, we could identify that the intracellular signaling pathway involved in this phenomenon was the Src/PI3K/MED/ERK kinases.

In a second step, thanks to the use of transgenic mice expressing a reporter protein from the UPS, we could determine how the P2Y<sub>2</sub> receptor plays a key role in the alteration of cellular proteostasis induced by a pro-inflammatory stimulus (LPS). These results suggest that a close relation between the TLR4 receptor and P2Y<sub>2</sub> receptor exists, so TLR4 activation could induce impairment in cellular proteostasis by inhibition of the P2Y<sub>2</sub> receptor. Confirming this close relationship, we could also analyze how the P2Y<sub>2</sub> receptor activation was able to restore the LPS-induced proteostasis imbalance. These studies also revealed that astrocytes are the cellular lineage most susceptible to the proteostasis alteration induced by TLR4 receptor activation as well as the regulation of such activity by the P2Y<sub>2</sub> receptor.

Finally, thanks to employing a murine model that reproduces the Alzheimer's disease in its familiar variant, we have also been able to verify that in the course of this pathology there is a decrease in P2Y<sub>2</sub> receptor expression and how this fact is closely related with the decrease experienced by the UPS activity during the progression of the pathology.

In conclusion, we can confirm that extracellular nucleotides, through the P2Y<sub>2</sub> receptor, are able to regulate the UPS activity. In this way, the activation of this receptor by the dinucleotide Up<sub>4</sub>U induces a significant increase in the UPS activity. Moreover,

this positive modulating effect is able to restore the proteostasis cellular altered by proinflammatory stimulus such as LPS. Finally, we also postulate that P2Y<sub>2</sub> receptor activation could be a good therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease because it could balance the altered cellular proteostasis in order to delay the pathology progression.

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. SISTEMA PURINÉRGICO

### 1.1 Los nucleótidos en la neurotransmisión

El ATP (adenosina 5'-trifosfato) y otros nucleótidos se encuentran implicados en numerosos procesos biológicos fundamentales para el correcto funcionamiento celular como son: la regulación enzimática, el metabolismo celular, mantenimiento de los gradientes iónicos de membrana y el movimiento celular. Además, estos compuestos son integrantes estructurales de los ácidos nucleicos (Khakh & Burnstock 2009). El enorme retraso en el reconocimiento del papel que juegan los nucleótidos como mensajeros extracelulares fue debido a que se pensaba que el ATP solamente poseía funciones intracelulares, al ser incapaz de atravesar por sí mismo la membrana plasmática debido a su naturaleza iónica y a su gran tamaño. Sin embargo, hoy en día se conoce la participación de los nucleótidos en multitud de procesos extracelulares entre los que se encuentran la contracción muscular, la secreción endocrina y paracrina, la respuesta inmune e inflamatoria, la agregación plaquetaria o la función cardíaca. Por otro lado, dentro del sistema nervioso, el ATP participa en la transmisión del dolor, en el control central de funciones autónomas y en la modulación de la neurotransmisión (Burnstock 2013).

Las primeras evidencias de la acción de los nucleótidos como mensajeros extracelulares, fueron aportadas por Drury y Szent-Györgyi en 1929 a raíz de estudios realizados en el sistema cardiovascular (Drury & Szent-Gyorgyi 1929). Sin embargo, pasaron 40 años hasta que Burnstock descubrió la existencia de unos nervios que denominó no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC) ya que liberaban ATP como un agente neurotransmisor (Burnstock *et al* 1970). En 1983, Jahr y Jessel obtuvieron la primera prueba directa de las acciones extracelulares del ATP en el sistema nervioso central (SNC), al registrar corrientes de entrada de iones en neuronas del asta dorsal de la médula espinal de rata tras la estimulación con ATP (Jahr & Jessell 1983). Simultáneamente, el grupo de Krishtal observó el mismo efecto en neuronas de ganglios sensoriales (Krishtal *et al* 1983). Posteriormente, se describió la implicación del ATP en la transmisión de sensaciones propioceptivas (Salter *et al* 1993) y nociceptivas a nivel medular (Chen *et al* 1995). Más tarde se registraron por primera vez corrientes postsinápticas excitatorias en cortes de habénula medial (Edwards *et al* 1992) y en el

hipocampo de rata (Pankratov *et al* 1998). Todo ello indicaba que el ATP debía ser considerado un neurotransmisor a corto plazo en el SNC. Sin embargo, los nucleótidos también pueden ejercer acciones a largo plazo en las neuronas, ya que participan en procesos como diferenciación, crecimiento de neuritas, además de intervenir en procesos patológicos como isquemia o enfermedades neurodegenerativas (Burnstock 2008).

Además de los nucleótidos clásicos, se conoce una familia de nucleótidos relacionados estructuralmente con el ATP denominados dinucleótidos polifosfatos. Se trata de compuestos naturales o sintéticos formados por dos nucleósidos (normalmente adenosina o uridina) unidos por una cadena de grupos fosfato de longitud variable ( $n=2-7$ ). En 1988, se encontró que los dinucleótidos polifosfatos se encontraban co-almacenados con transmisores clásicos en vesículas secretoras neurales (Rodríguez del Castillo *et al* 1988) o en vesículas sinápticas colinérgicas y monoaminérgicas (Miras-Portugal *et al* 1999, Pintor *et al* 1992). Estos compuestos también se liberan por exocitosis junto con el ATP en terminales nerviosas de rata (Pintor *et al* 1995), lo cual confirma el papel que juegan en la neurotransmisión.

## **1.2 Almacenamiento y liberación de nucleótidos.**

Para que el ATP o cualquier otro nucleótido se comporte como un neurotransmisor es necesario que se encuentre presente en el medio extracelular. Hasta hace poco tiempo se asumía que la única fuente de ATP extracelular procedía de células dañadas o muertas, sin embargo, hoy en día está reconocido que la liberación de ATP de células sanas es un proceso fisiológico mediado por mecanismos exocitóticos y no exocitóticos (Bodin & Burnstock 2001, Lazarowski 2012, Lazarowski *et al* 2003).

El almacenamiento de nucleótidos y dinucleótidos en el interior de vesículas de secreción permite que estos compuestos lleguen a alcanzar concentraciones de hasta 100 mM, concentraciones muy superiores a las que se encuentran en el citoplasma celular (2-5 mM). Este hecho pone de manifiesto la necesidad de un sistema de transporte activo específico. Inicialmente se identificaron algunas características funcionales y cinéticas de dicho transportador, como es su baja especificidad (lo que le permite transportar una gran variedad de nucleótidos), o su comportamiento cinético mnemónico (Gualix *et al* 1997, Gualix *et al* 1999). En 2008, Sawada y colaboradores

lograron identificar y clonar el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT), que ha sido identificado tanto en humano como en ratón. Este transportador se expresa principalmente en el cerebro y en la médula adrenal, donde juega un papel fundamental en el almacenamiento de nucleótidos (Sawada *et al* 2008).

El ATP y otros nucleótidos se almacenan en una amplia variedad de vesículas de secreción, como por ejemplo en las vesículas aminérgicas y colinérgicas de los tejidos neurales o neuroendocrinos (Burnstock 2007a). Así, se ha descrito que el ATP se libera desde terminales colinérgicas (Diaz-Hernandez *et al* 2001), aminérgicas (Giraldez *et al* 2001) y GABAérgicas del SNC (Gomez-Villafuertes *et al* 2003), a través de un mecanismo de liberación exocitótica y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pero además también se han descrito mecanismos de liberación no exocitótica de nucleótidos de adenina en respuesta a estímulos como la hipoxia, inflamación, estrés mecánico o daño tisular (Bodin & Burnstock 2001). Este tipo de liberación está mediado por una serie de transportadores o canales que forman parte de la superfamilia de proteínas ABC (del inglés “ATP-binding cassette”, transportadores de membrana dependientes de ATP). Actualmente, la familia conocida como ABCC es la candidata más plausible para realizar esta función. Aunque otras hipótesis señalan que en la liberación no exocitótica de ATP están involucrados los canales de conexinas y panexinas. Como norma general, las conexinas forman uniones estrechas entre dos células adyacentes, permitiendo el paso de iones y nucleótidos a través de la membrana (Vinken *et al* 2011). Por otro lado, los canales de panexina son similares estructuralmente a los hemicanales de conexina y también actúan como canales de liberación de ATP desde el citosol al espacio extracelular (Lohman & Isakson 2014).

### **1.3 Degradación de nucleótidos**

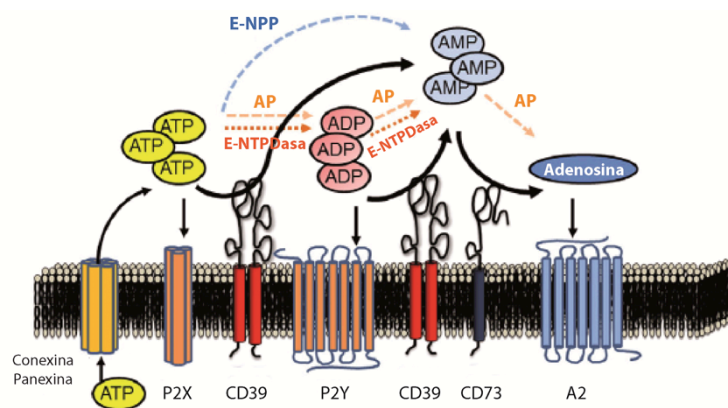
Como todos los neurotransmisores, una vez liberados y ejercida su acción, los nucleótidos deben ser inactivados, degradados o retirados del medio extracelular para limitar sus efectos. Así, una vez en la hendidura sináptica, son rápidamente hidrolizados por unas enzimas extracelulares específicas denominadas ectonucleotidasas. Como consecuencia de esta hidrólisis los nucleótidos van perdiendo secuencial o totalmente sus grupos fosfato, generando diferentes metabolitos hasta sus correspondientes

nucleósidos precursores (Zimmermann *et al* 2012), que a su vez pueden actuar como ligandos fisiológicos de otros receptores purinérgicos.

Las ectonucleotidasas se diferencian entre ellas dependiendo de su preferencia y afinidad por el sustrato, del producto formado, de la dependencia de cationes y de su pH óptimo catalítico. Se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos y actúan consecutivamente dando lugar a cascadas hidrolíticas. Las ectonucleotidasas suelen encontrarse ancladas a la membrana celular con su dominio catalítico orientado hacia el espacio extracelular. Las ectonucleotidasas se pueden clasificar en cuatro subfamilias (**Figura 1**):

- a) Ectonucleósido trifosfato-difosfohidrolasas (E-NTPDasas): también se conocen como ecto-ATPasas, ecto-ADPasas, ecto-apiratasas o CD39. Esta familia está formada por 8 miembros e hidrolizan nucleósidos tri- y difosfato, generando los correspondientes nucleósidos monofosfato (Kukulski *et al* 2005).
- b) Fosfatasas alcalinas (AP): las cuatro isoformas de la familia (placentar, intestinal, células germinales y no específica de tejido), poseen un pH óptimo alcalino (Ogata *et al* 1988) y se encargan de liberar el fosfato inorgánico de una gran variedad de compuestos. De esta manera son capaces de hidrolizar nucleósidos 5'-tri-, -di- y -monofosfato, generando los correspondientes nucleósidos precursores (Millan 2006).
- c) Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas (E-NPP): forman parte de la superfamilia de las fosfatasas alcalinas, con las que comparten su pH óptimo alcalino. Los tres miembros de esta familia, NPP1, 2 y 3, hidrolizan enlaces 5'-monodiestéer en nucleótidos y sus derivados, generando la liberación de 5'-monofosfato (Goding *et al* 2003, Stefan *et al* 2005). También pueden hidrolizar otros compuestos, como los dinucleótidos polifosfato (Vollmayer *et al* 2003).
- d) Ecto-5'-nucleotidasa (CD-73): es una proteína dimérica que hidroliza los nucleósidos monofosfato generando los respectivos nucleósidos. Es decir, cataliza la etapa final de la cascada hidrolítica de los nucleótidos. Se encuentra ampliamente distribuida en los diferentes tejidos de mamíferos (Zimmermann 2000).





**Figura 1. Esquema representativo de la acción de las diferentes ectonucleotidasas sobre la señalización purinérgica.** Los nucleótidos liberados al espacio extracelular activan receptores P2Y y P2X. Su acción finaliza por la acción de las ectonucleotidasas que pueden, o bien degradar los nucleótidos trifosfato directamente hasta adenosina, o generar nucleótidos difosfato y monofosfato para finalmente ser degradados a sus nucleósidos precursores. Esta adenosina puede activar a su vez a los receptores A2, siendo finalmente recaptada para la síntesis de nuevos nucleótidos. Adaptado de (Novitskaya et al 2016).

## 1.4 Receptores de nucleósidos

Hasta la fecha se han clonado y caracterizado cuatro tipos de receptores específicos de adenosina, denominados inicialmente receptores P1. Actualmente se les denomina como: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> (Yaar et al 2005). Todos ellos poseen 7 dominios transmembrana y están acoplados a proteínas G y principalmente modulan la actividad de la adenilato ciclasa. Existen varios agonistas y antagonistas específicos de los distintos subtipos de receptores, los cuales se muestran en la **Tabla 1** (Burnstock 2007b). Estos receptores pueden mediar diversos efectos fisiológicos dentro de los sistemas cardiovascular, inmune y nervioso (Ledent et al 1997, Sun et al 2001).

**Tabla 1. Relación de los distintos agonistas y antagonistas de los receptores de nucleósidos.** Los datos reflejados en la Tabla han sido obtenidos de Burnstock, 2007

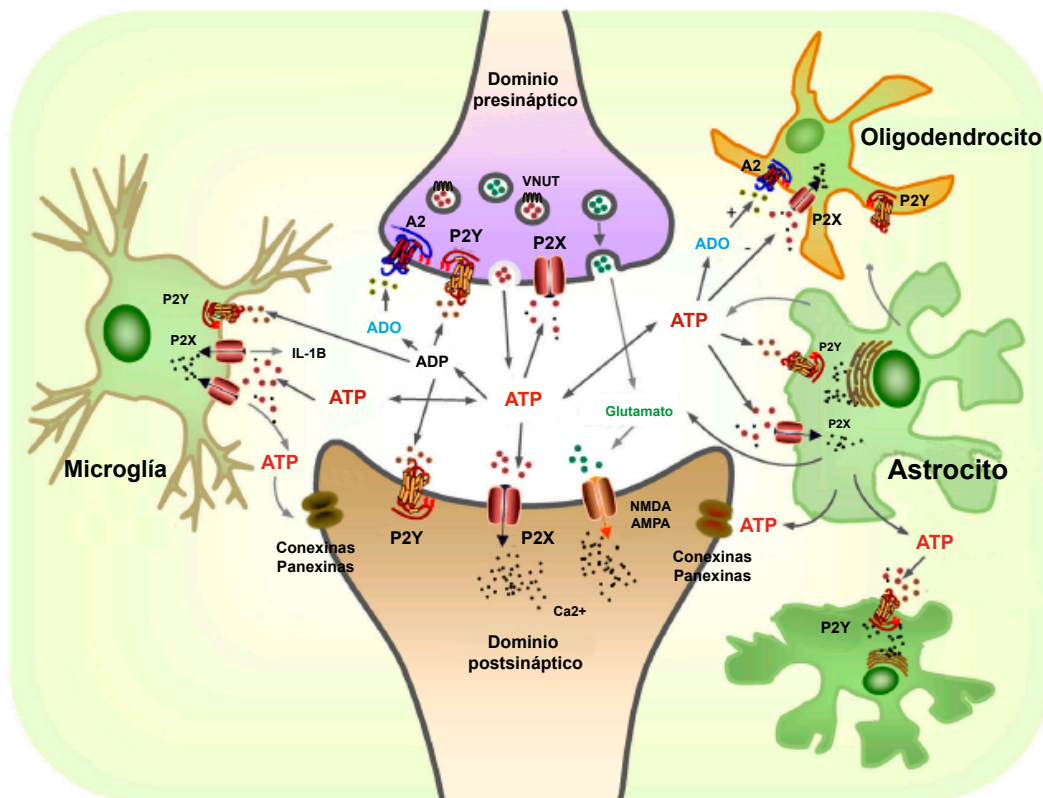
Receptor P1	Agonista	Antagonista
A <sub>1</sub>	CCPA, CPA, S-ENBA, CVT-510	DPCPX, N-0840, MRS1754, WRC-0571
A <sub>2A</sub>	CGS 21680, HE-NECA, CVT-3146	KF17837, SCH58261, ZM241385, KW 6002
A <sub>2B</sub>	NECA (no selectivo)	Enpofrilina, MRE2029-F20, MRS17541, MRS 1706
A <sub>3</sub>	IB-MECA, 2-Cl-IB-MECA, DBXRM, VT160	MRS1220, L-268605, MRS1191, MRS1523, VUF8504

## 1.5 Receptores de nucleótidos

Los receptores de nucleótidos, o receptores P2, se dividen en dos grandes familias en función de su estructura molecular y de los mecanismos de transducción de señales acoplados a su activación. Por un lado se encuentran los receptores ionotrópicos P2X, que son canales iónicos activados por ligando, y por otro lado, los receptores metabotrópicos P2Y acoplados a proteínas G (Abbracchio & Burnstock 1994, Burnstock 2007b, Coddou *et al* 2011, von Kugelgen & Harden 2011). La nomenclatura empleada en esta Tesis Doctoral tiene en cuenta las últimas directrices del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) (Coddou *et al* 2011).

La identificación y caracterización farmacológica de los receptores P2 no resulta una tarea sencilla debido a la falta de disponibilidad de agonistas y antagonistas específicos y potentes para diferenciar los distintos subtipos de receptores. Por este motivo se tiende a calificar a los receptores endógenos con el sufijo anglosajón “-like” hasta que se apliquen criterios adicionales como pueden ser la utilización de herramientas de Biología Molecular más selectivas o el empleo de modelos animales transgénicos que permitan una identificación más específica del receptor objeto de estudio.

Recientemente se ha denominado *purinoma* al complejo responsable de los efectos biológicos mediados por los nucleótidos y nucleósidos constituidos por bases purínicas o pirimidínicas (Volonte & D'Ambrosi 2009). Este complejo está formado por una gran variedad de ligandos purinérgicos y pirimidinérgicos, receptores purinérgicos de nucleósidos y nucleótidos, ectonucleotidasas y transportadores de nucleósidos y nucleótidos, tal y como se muestra en la **Figura 2**.

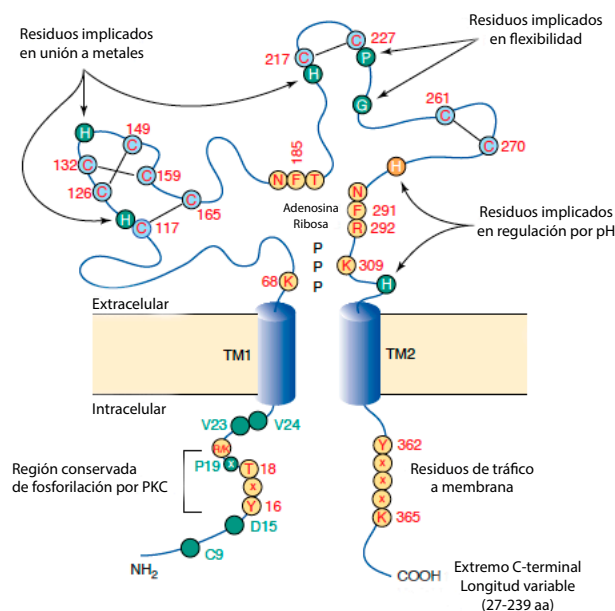


**Figura 2. Esquema representativo del purinoma en el Sistema Nervioso Central.** La figura representa la acción coordinada de receptores purinérgicos implicados en la interacción biológica de los ligandos extracelulares tanto en neuronas como en glía: receptores P2X y P2Y de nucleótidos, receptores  $A_2$  de nucleósidos, ectonucleotidasas, transportadores de nucleótidos (VNUT) y canales de conexinas y panexinas. Adaptado de (Del Puerto et al 2013).

### 1.5.1 Receptores ionotrópicos P2X

Los receptores P2X son canales iónicos insertados en la membrana plasmática que, una vez activados por nucleótidos y dinucleótidos extracelulares, permiten el paso selectivo de cationes de pequeño tamaño ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) (Samways et al 2014). Hasta la fecha se han clonado y caracterizado siete subunidades P2X diferentes, denominadas de P2X1 a P2X7 (Nicke et al 1998, Vial et al 2004). Los receptores P2X constituyen una familia estructuralmente diferenciada dentro del grupo de canales iónicos activados por ligando (North 1996). Poseen extremos amino y carboxilo citosólicos y dos regiones transmembrana (TM1 y TM2), de las cuales la primera está involucrada en la apertura del canal y la segunda en la formación del mismo (Figura 3). El extremo amino tiene un tamaño uniformemente corto en todas las subunidades (24-31 aminoácidos) y participa directamente en la regulación de la conductividad iónica a través de estos canales (Liu &

Hofmann 2003). Por el contrario, el extremo carboxilo es muy variable en secuencia y tamaño, lo que sugiere que podría conferir propiedades específicas a cada receptor. La región C-terminal presenta en todas las isoformas un motivo YxxxK conservado cercano al TM2 que parece estar asociado al correcto transporte del receptor a la membrana y a la estabilización de su expresión en la superficie celular (Bobanovic *et al* 2002, Chaumont *et al* 2004). Por otro lado, entre el 50 y el 70% de la estructura de estas subunidades lo forma un bucle extracelular situado entre los dos segmentos transmembrana. Este dominio cuenta también con numerosos sitios de glicosilación implicados en la afinidad por el ligando (Hu *et al* 2002).



**Figura 3. Modelo estructural de receptores P2X.** Se representan los extremos C y N-terminal intracelulares, el dominio extracelular y los dominios transmembrana TM1 y TM2. Se muestra la región conservada de interacción con PKC en el extremo N-terminal y la región presente en el extremo C-terminal, de longitud variable, que está implicada en el transporte a membrana. Aparecen indicados los aminoácidos implicados en el reconocimiento de ATP, regulación por pH, por metales o en los cambios conformacionales del receptor. Adaptado de (Vial *et al* 2004).

Los dos segmentos transmembrana que presentan las subunidades P2X no son capaces por sí solos de formar un poro iónico, lo que sugiere que las distintas subunidades deben asociarse para formar un canal funcional (Aschrafi *et al* 2004, Nagaya *et al* 2005, Nicke *et al* 1998). Hasta la fecha se han descrito las siguientes

combinaciones de receptores heteroméricos: P2X1/P2X2, P2X1/P2X4, P2X1/P2X5, P2X2/P2X3, P2X2/P2X6, P2X4/P2X6 y P2X2/P2X5 (Abbracchio *et al* 2009).

En general, siguiendo criterios estrictamente farmacológicos (**Tabla 2**), se pueden distinguir dos grandes grupos dentro de la familia de los receptores P2X: por un lado el grupo formado por los receptores P2X1 y P2X3 que se caracterizan por su elevada afinidad por el ATP y que pueden ser activados por el análogo sintético  $\alpha,\beta$ -meATP. El segundo grupo, que engloba los receptores P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 y P2X7, se caracteriza por receptores que muestran una menor afinidad por el ATP y son insensibles al  $\alpha,\beta$ -meATP (Coddou *et al* 2011).

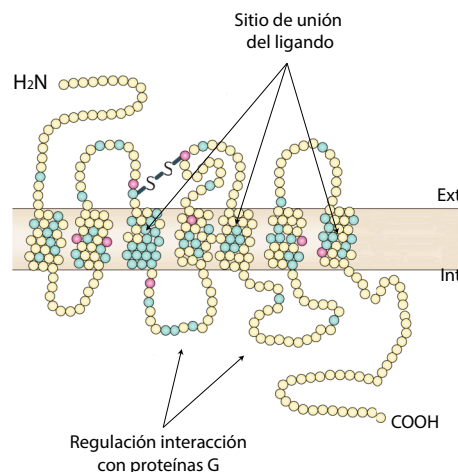
**Tabla 2. Relación de los diferentes agonistas y antagonistas empleados para la caracterización de los receptores P2X. Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de Burnstock, 2007**

Receptor	Agonista	Antagonista
<b>P2X1</b>	$\alpha,\beta$ -meATP=ATP=2-MeSATP, L- $\beta,\gamma$ -meATP	TNP-ATP, Ip <sub>5</sub> I, NF023, NF449
<b>P2X2</b>	ATP $\geq$ ATP $\gamma$ S $\geq$ 2-MeSATP $\gg$ $\alpha,\beta$ -meATP	Suramina, isoPPADS, RB2, NF770, NF279
<b>P2X3</b>	2-MeSATP $\geq$ ATP $\geq$ $\alpha,\beta$ -meATP $\geq$ Ap <sub>4</sub> A	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110, Ip <sub>5</sub> I, rojo fenol
<b>P2X4</b>	ATP $\gg$ $\alpha,\beta$ -meATP, CTP	TNP-ATP, BBG, fenolftaleína
<b>P2X5</b>	ATP $\gg$ $\alpha,\beta$ -meATP, ATP $\gamma$ S	Suramina, PPADS, BBG
<b>P2X6</b>	2-MeSATP $>$ ATP= $\alpha,\beta$ -meATP	TNP-ATP $>$ PPADS
<b>P2X7</b>	BzATP $>$ ATP $\geq$ 2-MeSATP $\gg$ $\alpha,\beta$ -meATP	KN-62, KN04, MRS2427, O-ATO

En cuanto a los dinucleótidos, todos los receptores P2X pueden ser activados por estos compuestos, siendo el Ap<sub>4</sub>A el más común en la mayoría de los casos (Pintor *et al* 1995). La falta de selectividad de las herramientas farmacológicas empleadas hasta la fecha no se restringe a los agonistas, ya que los antagonistas más utilizados como son la Suramina y PPADS, bloquean la mayoría de los receptores P2X y, en el caso de la Suramina, también muchos receptores P2Y.

### 1.5.2 Receptores metabotrópicos P2Y

Los receptores P2Y, que se encuentran exclusivamente en eucariotas, son receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Actualmente se han clonado y caracterizado en tejidos humanos o de mamíferos ocho subtipos denominados P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>. En general, los receptores P2Y poseen 7 segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados entre sí por tres lazos extracelulares y tres lazos intracelulares, con el extremo N-terminal extracelular y el extremo C-terminal intracelular (**Figura 4**). Poseen un tamaño que oscila desde los 328 aminoácidos del P2Y<sub>6</sub> hasta los 377 del P2Y<sub>2</sub>, con una masa molecular de entre 41 y 70 KDa, y compartiendo, en el caso de los receptores P2Y humanos, entre un 20% y un 50% de homología, (Shaver 2001). Además, poseen secuencias altamente conservadas en los dominios transmembrana 3, 5 y 7 que intervienen de forma crítica en la unión del ligando.



**Figura 4. Modelo estructural de receptores P2Y.** Se representan los 7 segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos extracelulares y tres lazos intracelulares, con el extremo N-terminal extracelular y el extremo C-terminal intracelular. Además, se muestran los puentes disulfuro, los sitios de unión del ligando así como la zona de regulación de interacción con otras proteínas G. Adaptado de (Fields & Burnstock 2006).

Todos los receptores P2Y poseen cuatro residuos de cisteína en los lazos extracelulares y en el extremo N-terminal, que pueden formar uno o dos puentes disulfuro, y que están implicados en numerosas funciones. Por ejemplo, el puente formado entre el segmento transmembrana 3 y el lazo extracelular 2 se requiere para el correcto tráfico a la membrana del P2Y<sub>1</sub> humano (Hoffmann *et al* 1999), mientras que el

P2Y<sub>12</sub> muestra un único puente disulfuro y dos cisteínas libres que pueden actuar como dianas para antitrombóticos que inactivan el receptor (Ding *et al* 2003). En los lazos extracelulares del P2Y<sub>2</sub> se encuentra también una secuencia de interacción con integrinas, (que se describe con más detalle en el apartado 1.5.3.2), que es necesaria para el mantenimiento del receptor en un estado de alta afinidad (Weisman *et al* 2005). Sin embargo, los receptores P2Y presentan un mayor grado de variabilidad en el extremo C-terminal y en los lazos intracelulares implicados en la interacción con las proteínas G.

Constitutivamente o bajo determinadas situaciones, los receptores P2Y pueden formar homo o heterodímeros, quizás para dotar de mayor estabilidad a su estructura. Un ejemplo es la homodimerización de P2Y<sub>1</sub> o de P2Y<sub>6</sub> como consecuencia de la exposición continuada al agonista, probablemente de forma previa a su internalización y renovación (Choi *et al* 2008, D'Ambrosi *et al* 2007, Marchese *et al* 1999). También se han descrito homo-oligómeros para el P2Y<sub>4</sub> en neuronas del SNC y SNP (D'Ambrosi *et al* 2006). Además, tanto el receptor P2Y<sub>4</sub> como el receptor P2Y<sub>6</sub> muestran dominios apropiados para la interacción con otros receptores como los P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub> (D'Ambrosi *et al* 2007). Igualmente, en líneas celulares HEK293 y 1321N1 de astrocitoma se ha comprobado, mediante técnicas de co-inmunoprecipitación, que la hetero-oligomerización de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>11</sub> estaría regulando la internalización del propio receptor P2Y<sub>11</sub> (Ecke *et al* 2008). Además de los oligómeros formados entre receptores P2Y, éstos pueden interaccionar con otros receptores, como se ha descrito para el P2Y<sub>1</sub> y el receptor A<sub>1</sub> de adenosina, que presenta un perfil farmacológico mixto, respondiendo a nucleótidos difosfato de adenina y siendo sensible a antagonistas del receptor A<sub>1</sub> (Yoshioka & Nakata 2004).

Farmacológicamente, los receptores P2Y se pueden clasificar en tres grupos, atendiendo a la afinidad que muestran frente a los nucleótidos de adenina y uracilo. El primer grupo está formado por los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub>, que son activados únicamente por nucleótidos de adenina, especialmente por ADP, siendo el receptor P2Y<sub>11</sub> el único que se activa por ATP (King *et al* 2000). Otro grupo lo forman los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>, ambos activados tanto por nucleótidos de adenina como de uracilo, y el receptor P2Y<sub>6</sub>, que es activado específicamente por pirimidinas. Por último tendríamos el receptor P2Y<sub>14</sub>, el cual es activado por UDP-glucosa y por otros UDP-azúcares (Abbracchio *et al* 2006). Hay que destacar que los mononucleótidos de adenina



y uracilo (AMP y UMP) son inactivos para los receptores P2Y. En la **Tabla 3** se muestran los principales agonistas y antagonistas identificados para los receptores P2Y.

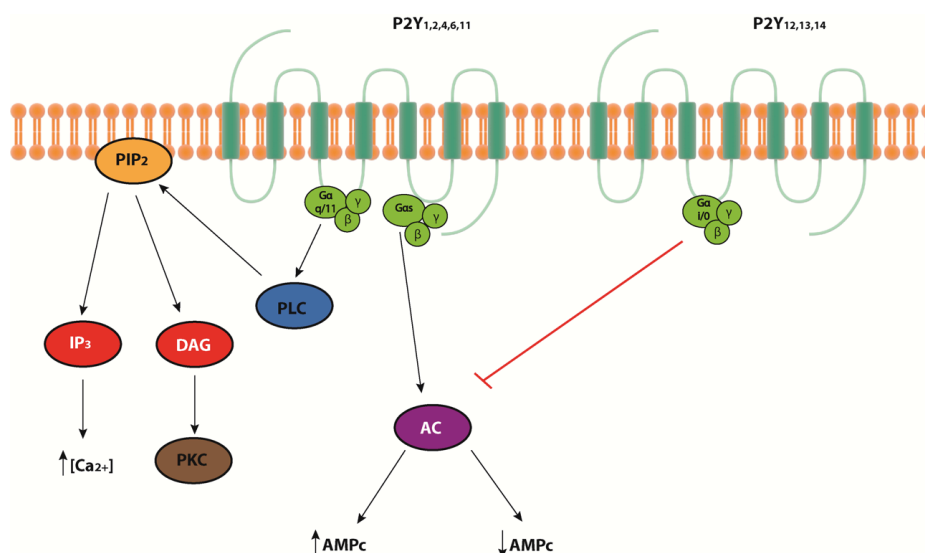
*Tabla 3. Relación de los diferentes agonistas y antagonistas identificados para la caracterización de los receptores P2Y. Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de (Weisman et al 2012b)*

Receptor	Agonista	Antagonista
<b>P2Y<sub>1</sub></b>	<b>Endógeno:</b> ADP <b>Sintético:</b> 2-MeSADP=ADPβS>2-MeSATP, MRS2365	MRS2179, MRS2500, MRS2279, PPADS, Suramina, RB2, ATPαS
<b>P2Y<sub>2</sub></b>	<b>Endógeno:</b> UTP o ATP <b>Sintético:</b> UTPγS, INS37217, INS365, Ap <sub>4</sub> A, INS45973, MRS2768, PSB1114, 2-S-UTP, 6-nitro-UTP, UTPαS	Suramina, RB2, AR-C26313, AR-C118925, PSB716
<b>P2Y<sub>4</sub></b>	<b>Endógeno:</b> UTP (humanos), UTP o ATP (ratón, rata) <b>Sintético:</b> UTPγS, INS37217, 5-Br-UTP, INS365	RB2, PPADS
<b>P2Y<sub>6</sub></b>	<b>Endógeno:</b> UDP <b>Sintético:</b> UDPβS, MRS2693, PSB0474, INS48823, α,β-MeUDP, 5-Br-UTP	PPADS, Suramina, RB2, MRS2578, MRS2567, MRS2575
<b>P2Y<sub>11</sub></b>	<b>Endógeno:</b> ATP <b>Sintético:</b> AR-C67085, BzATP, ATPγS, UTP, NF546	Suramina, RB2, NF157, 5'-AMPS, NF340
<b>P2Y<sub>12</sub></b>	<b>Endógeno:</b> ADP <b>Sintético:</b> 2-MeSADP, 2-MeSATP	AR-C69931MX, INS49266, PSB0413, ARL66096, 2-MeSAMP
<b>P2Y<sub>13</sub></b>	<b>Endógeno:</b> ADP <b>Sintético:</b> 2-MeSADP, 2-MeSATP, ADPβS, BzATP	PPADS, Suramina, RB2, Ap <sub>4</sub> A, MRS2211, AR-C67085, AR-C69931
<b>P2Y<sub>14</sub></b>	<b>Endógeno:</b> UDP-glucosa, UDP-galactosa <b>Sintético:</b> MRS2690	No descritos



Es importante recalcar que en los estudios farmacológicos es difícil de determinar cuál es la potencia óptima de los diferentes agonistas. Esto es debido principalmente a las posibles contaminaciones de los nucleótidos comerciales utilizados, así como a la liberación de nucleótidos endógenos (los cuales pueden iniciar procesos de desensibilización del receptor) o a la hidrólisis de los nucleótidos por parte de las ectonucleotidasas (Harden *et al* 1997).

En cuanto a las rutas de transducción (**Figura 5**), los receptores P2Y activan diversos mecanismos de señalización intracelular entre los que se encuentran la hidrólisis de los lípidos de inositol por la fosfolipasa C (PLC), y la activación o inhibición de la adenilato ciclasa (AC).



**Figura 5. Ruta de señalización intracelular seguida por los receptores P2Y.** Los receptores P2Y<sub>1,2,4,6,11</sub> están acoplados a la proteína G<sub>q</sub> que a través de PLC hidroliza PIP<sub>2</sub> para activar los segundos mensajeros IP<sub>3</sub> y DAG. El receptor P2Y<sub>11</sub> puede acoplarse a la proteína G<sub>αs</sub> activando la AC y aumentando los niveles de AMPc. Sin embargo, los receptores P2Y<sub>12,13,14</sub> están acoplados a la proteína G<sub>i/o</sub> que inhibe la AC y disminuye los niveles de AMPc.

Por un lado, los receptores P2Y<sub>1, 2, 4, 6, 11</sub> están acoplados principalmente a la activación de PLC, a través de una proteína G<sub>q/11</sub> lo cual promueve la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) para generar dos segundos mensajeros: el Inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), que provoca incrementos en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> al activar receptores de retículo endoplásmico, y el diacilglicerol (DAG), que activa la

proteína quinasa C (PKC) encargada de modular la síntesis y/o liberación de ácido araquidónico (AA), prostaglandinas y óxido nítrico (NO) (Abbracchio *et al* 2006, Weisman *et al* 2012c). El receptor P2Y<sub>11</sub> es el único que se ha encontrado acoplado a la proteína G<sub>αs</sub>, de forma que es capaz de activar la adenilato ciclasa (AC) e incrementar los niveles intracelulares de AMPc (Communi *et al* 1997). Por su parte, los receptores P2Y clonados más recientemente, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>, parecen estar relacionados mayoritariamente con la inhibición de la AC y disminución de los niveles de AMPc por su acoplamiento a una proteína sensible a la toxina pertúsica G<sub>i/o</sub>.

Los receptores P2Y, como la mayoría de receptores acoplados a proteínas G, se desensibilizan cuando son expuestos de manera prolongada a un agonista, ya que se producen fosforilaciones del propio receptor a nivel intracelular que promueven la unión a β-arrestinas con la consiguiente internalización y/o degradación del receptor (Shenoy & Lefkowitz 2011). La mayoría de los receptores P2Y interaccionan con β-arrestina-2, aunque los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> también interaccionan con β-arrestina-1 (Hoffmann *et al* 2008).

### 1.5.3 Receptor metabotrópico P2Y<sub>2</sub>

Se ha descrito que el receptor P2Y<sub>2</sub> lo expresan células epiteliales y endoteliales, células de músculo liso, leucocitos y cardiomiocitos (Kunapuli & Daniel 1998, Lustig *et al* 1992, Pillois *et al* 2002, Seye *et al* 2002). El receptor P2Y<sub>2</sub> también ha sido identificado en líneas celulares de astrocitos inmortalizados, células de Schwann, médula espinal, astrocitos corticales, células de astrocitoma, neuronas corticales de rata y oligodendrocitos en el SNC y SNP (Berti-Mattera *et al* 1996, Ho *et al* 1995, Kirischuk *et al* 1995, Weisman *et al* 1999). Sin embargo, hay pocos estudios que hayan analizado en profundidad qué linajes celulares expresan el receptor P2Y<sub>2</sub> en el cerebro *in vivo*. No obstante, se ha descrito que los niveles de ARN mensajero (ARNm) de P2Y<sub>2</sub> en rodajas de cerebro de roedores son relativamente bajos y que mayoritariamente se expresa en hipocampo y cerebelo (Erb *et al* 2006). En este mismo trabajo, detectaron ARNm de P2Y<sub>2</sub> en astrocitos, neuronas y microglia hipocampales, además de observar que los niveles de mensajero del receptor se encontraban elevados en el giro dentado de estos ratones cuando eran sometidos a un estímulo proinflamatorio como la Interleuquina 1β (IL-1β) (Kong *et al* 2009).

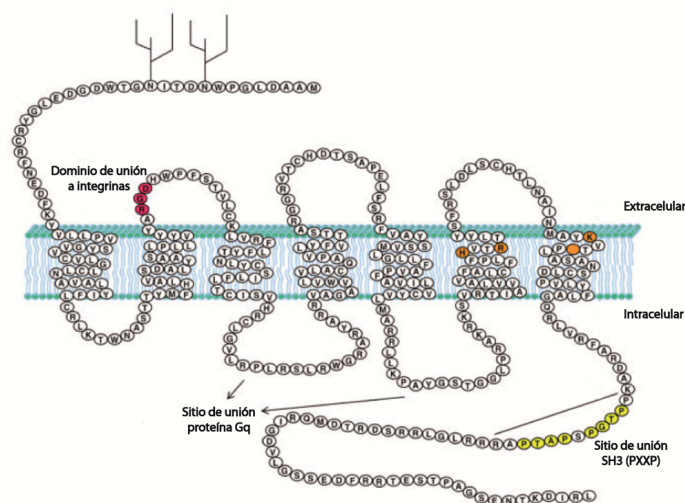
### 1.5.3.1 Características farmacológicas del receptor P2Y<sub>2</sub>

El receptor P2Y<sub>2</sub> se activa equipotencialmente por sus agonistas endógenos ATP o UTP con un valor de  $EC_{50} \approx 0,5-3 \mu M$  (Weisman *et al* 2005). Además se ha descrito que simples modificaciones en la estructura de estos compuestos potencian la selectividad hacia el receptor. Por ejemplo, el agonista sintético UTP $\gamma$ S muestra una mayor afinidad por el receptor P2Y<sub>2</sub> y presenta una mayor resistencia a la hidrólisis que el UTP pero es más susceptible a la oxidación química (Lazarowski *et al* 1996). Por otro lado, el agonista MRS2768 (uridín tetrafosfato  $\delta$ -fenil-éster) es selectivo para el receptor P2Y<sub>2</sub> pero presenta un  $EC_{50} = 1,89 \mu M$  (Ko *et al* 2008). En cuanto a los dinucleótidos, el compuesto diadenosina tetrafosfato (Ap<sub>4</sub>A) presenta un  $EC_{50} = 0,72 \mu M$  y ha sido propuesto como un agonista endógeno del receptor P2Y<sub>2</sub> (Lazarowski *et al* 1995). Posteriormente, se propusieron otros dinucleótidos como posibles agonistas, como es el caso del Up<sub>4</sub>U (también conocido como diuridín-tetrafosfato, INS365 o Diquafosol) que presenta un  $EC_{50} = 0,1 \mu M$  (Pendergast *et al* 2001). En esta Tesis Doctoral se ha empleado como agonista selectivo del receptor P2Y<sub>2</sub> el dinucleótido Up<sub>4</sub>U ya que es el compuesto que presenta una mayor afinidad por el receptor P2Y<sub>2</sub>. Además posee una longitud óptima de la cadena de fosfatos para la activación del receptor y tiende a ser más resistente a la degradación por ectonucleotidasas que los nucleótidos trifosfato (Jacobson 2009).

Por otro lado, se han descrito pocos antagonistas selectivos para el receptor P2Y<sub>2</sub>. Así, tanto el compuesto Suramina (antagonista débil con un  $IC_{50} = 48 \mu M$ , (Muller *et al* 2002) como el compuesto RB2 (del inglés: *Reactive Blue 2*, Reactivo Azul 2) son antagonistas poco selectivos ya que también pueden bloquear varios receptores P2X (Charlton *et al* 1996). Los compuestos AR-C126313 y su análogo AR-C118925 fueron inicialmente propuestos como antagonistas selectivos del receptor P2Y<sub>2</sub>, sin embargo, en estudios posteriores se ha descrito que presentan baja afinidad por este receptor, de tal manera que sólo pueden actuar en el rango micromolar (Jacobson & Boeynaems 2010). Debido a la carencia de antagonistas selectivos para el receptor P2Y<sub>2</sub>, otra forma eficaz de confirmar la participación del receptor en un proceso fisiológico sería la utilización de silentes (shRNA) o el uso de ratones transgénicos que presenten delecionado el receptor P2Y<sub>2</sub> (Kim *et al* 2012, Yu *et al* 2008).

### 1.5.3.2 Características estructurales y señalización intracelular mediada por el receptor P2Y<sub>2</sub>

Estructuralmente, el receptor P2Y<sub>2</sub> presenta siete dominios transmembrana, con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular (**Figura 6**). En su primer bucle extracelular presenta un dominio Arg-Gly-Asp (RGD) que permite su unión a integrinas  $\alpha_v\beta_3/\beta_5$ . Esta unión permite que el receptor presente un estado de alta afinidad hacia el ligando (Weisman *et al* 2005). Por otro lado, en su extremo C-terminal y en el tercer bucle extracelular presenta secuencias de Ser/Thr que pueden ser dianas para quinasas asociadas a GPCR y a PKC. También presenta dominios ricos en prolina (motivos PXXP, donde P corresponde a Prolina y X a cualquier aminoácido) de homología SH3 en el extremo C-terminal que intervienen en la transactivación de las vías de señalización activadas por receptores de factores de crecimiento (Weisman *et al* 2005), y en la unión a proteínas Src y PI3K (Pawson 1995).



**Figura 6. Características estructurales del receptor P2Y<sub>2</sub>.** En la imagen se observa el dominio RGD necesario para la unión a integrinas (color rojo) y dos sitios de unión SH3 (color amarillo) en el extremo C-terminal intracelular para la transactivación de vías activadas por receptores de factores de crecimiento. En el segundo y tercer bucle intracelular se encuentran los sitios de unión de proteínas G<sub>q</sub>. En color naranja se muestran los aminoácidos implicados en la unión de los agonistas ATP/UTP. Adaptado de (Peterson *et al* 2010)

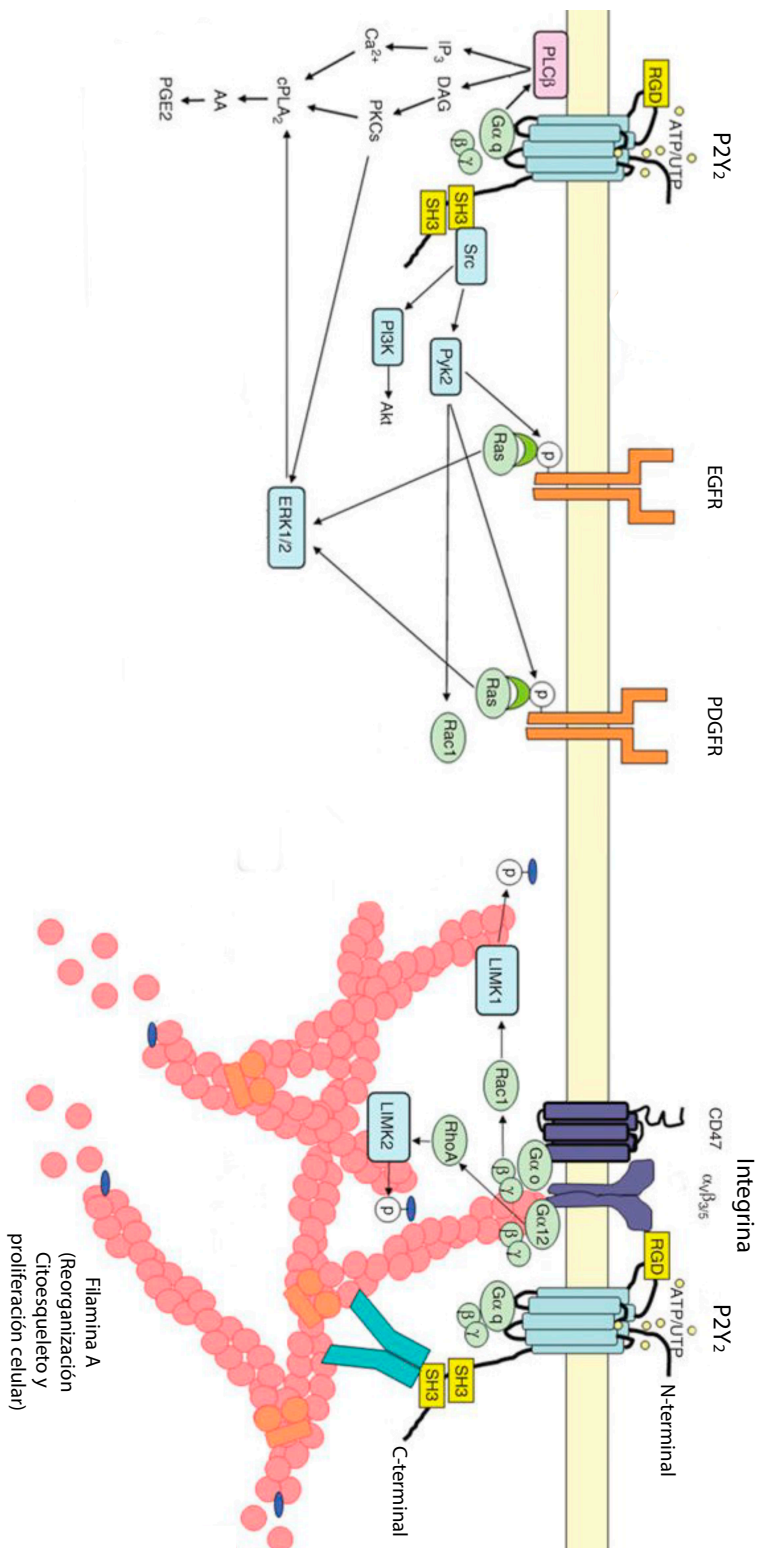
Además de la ruta canónica descrita en el apartado 1.5.2, las rutas de transducción mediadas por el receptor P2Y<sub>2</sub> han sido investigadas en profundidad durante muchos años (**Figura 7**). Por un lado, se ha descrito que el receptor P2Y<sub>2</sub> media

la activación de PKC y ERK1/2 permitiendo la activación de fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica (PLA<sub>2</sub>c) que hidroliza fosfolípidos de la membrana celular para producir ácido araquidónico (AA) (Xu *et al* 2002), o activar la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2). El AA es un precursor de quimioquinas proinflamatorias como eicosanoides, prostaglandinas y leucotrienos (Balsinde *et al* 2002) mientras que COX-2 juega un papel fundamental en la inflamación y astrogliosis reactiva característica de enfermedades neurodegenerativas (Brambilla & Abbracchio 2001).

También se ha demostrado que el receptor P2Y<sub>2</sub> se encuentra implicado en la regulación de la migración y proliferación de células microgliales y astrogliales (Kim *et al* 2012, Washburn & Neary 2006). En este proceso, el receptor necesita interactuar con las integrinas  $\alpha_v\beta_3/\beta_5$  a través del motivo RGD, cuando se encuentra unido a las proteínas G<sub>0</sub> y G<sub>12</sub> induciendo así la activación de RhoA y Rac, respectivamente (Erb *et al* 2001). Estas proteínas han sido ampliamente descritas como agentes reguladores de la polimerización y despolimerización de actina necesaria para la migración celular (Ridley 2001).

Otros trabajos sugieren que el incremento en la proliferación celular asociada al receptor P2Y<sub>2</sub> es debido a que la activación del receptor es capaz de inducir fosforilación y activación de receptores de factores de crecimiento. Este fenómeno induciría incrementos en las actividades de proteínas quinasas activadas por mitógenos (ERK1/2) y la tirosina quinasa de adhesión focal (RAFTK) a través de una vía dependiente de Src (Seye *et al* 2004, Soltoff *et al* 1998). Estudios en los que se deleccionaron los dos motivos de homología (SH3) en el receptor P2Y<sub>2</sub> confirmaron la regulación de la proliferación celular mediada por dicho receptor (Liu *et al* 2004). Sin embargo, se ha descrito que estos dominios SH3 no son necesarios para otras respuestas mediadas por el receptor P2Y<sub>2</sub> como la movilización de calcio intracelular o la activación de MAPK (Seye *et al* 2004).

Por otro lado, otros grupos han descrito que la presencia de residuos de Ser/Thr en el dominio C-terminal del receptor P2Y<sub>2</sub> pueden favorecer la interacción del receptor con la proteína filamina A, un regulador de la reorganización de citoesqueleto (Yu *et al* 2008), o bien jugar un papel en la desensibilización e internalización del receptor debido a la exposición continuada al agonista (Shenoy & Lefkowitz 2011).



**Figura 7. Rutas de transducción seguidas por el receptor P2Y<sub>2</sub>.** En el lado izquierdo de la figura se representa la ruta canónica seguida por el receptor P2Y<sub>2</sub> acoplado a proteína G<sub>q</sub>. Además, también se muestran los dominios SH3 en el extremo C-terminal del receptor P2Y<sub>2</sub> que permiten la transactivación de receptores de factores de crecimiento (EGFR, PDGFR) para la regulación de la proliferación celular. En el lado derecho de la figura, se muestra el dominio RGD del receptor P2Y<sub>2</sub> que permite la interacción con integrinas que se encargan de regular la reorganización de citoesqueleto. Adaptado de (Erb & Weisman 2012)

### 1.5.3.3 Implicación del receptor P2Y<sub>2</sub> en procesos de neuroinflamación y neuroprotección

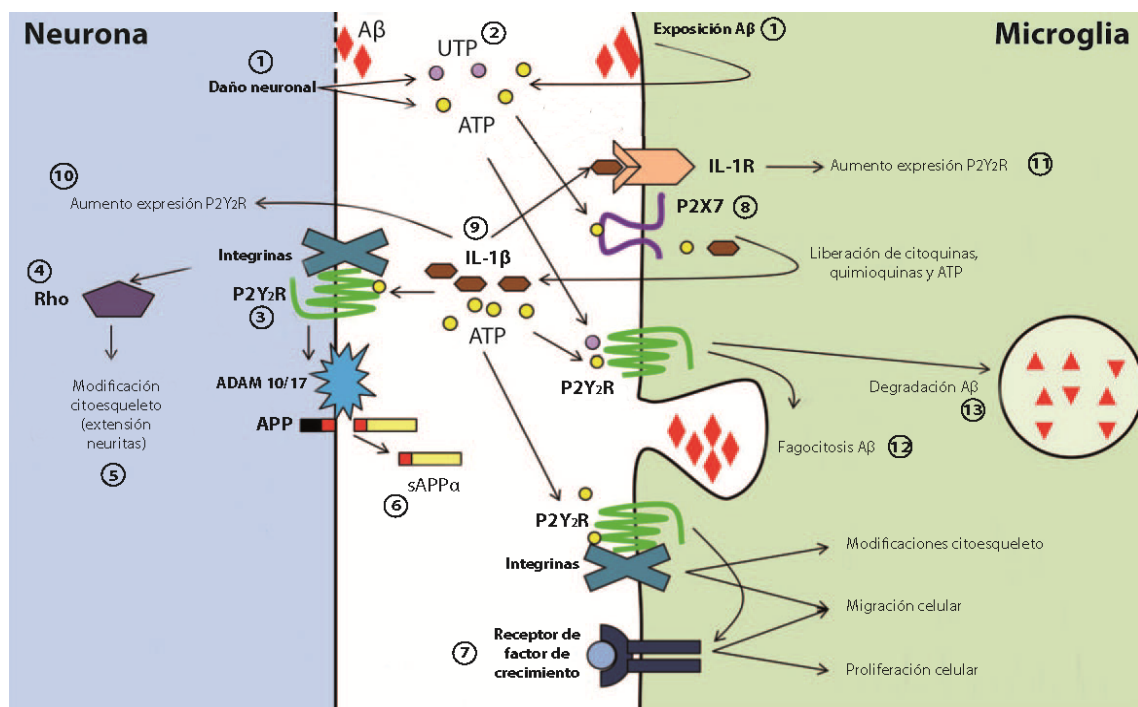
Se ha descrito ampliamente que la neuroinflamación es un proceso que juega un papel crucial en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas (Wyss-Coray & Rogers 2012). Sin embargo, existe una gran controversia en cuanto a si este proceso de neuroinflamación contribuye al progreso de la neurodegeneración o por el contrario, tiene una función neuroprotectora (Broussard *et al* 2012). A este respecto, se ha postulado que mientras la inflamación crónica puede ser un factor que contribuya a la progresión de la neurodegeneración (Akiyama *et al* 2000, Ho *et al* 2005), la inflamación aguda podría tener como función limitar y reparar la zona del cerebro dañada (Monsonogo & Weiner 2003).

Bajo condiciones patofisiológicas o bajo estímulos proinflamatorios como son la secreción de Interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> o el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), se produce la liberación ATP y UTP al espacio extracelular (Bodin & Burnstock 2001), los cuales pueden actuar como agonistas endógenos del receptor P2Y<sub>2</sub> (**Figura 8**). Además, bajo estas mismas condiciones inflamatorias, se produce un aumento de la translocación nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, (Wullaert *et al* 2011), el cual regula positivamente la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> (Degagne *et al* 2009). Dado que tanto las neuronas, como las células microgliales y astrocitos expresan el receptor P2Y<sub>2</sub>, se ha postulado que este receptor puede desempeñar un papel clave en las respuestas adaptativas celulares frente a estos niveles elevados de nucleótidos extracelulares (Weisman *et al* 2012b).

La microglía es un tipo de célula glial que constituye entre el 10-15% del número total de células que se encuentran en el cerebro (Lawson *et al* 1992). Ciertos estudios han encontrado que la activación del receptor ionotrópico P2X7 en células microgliales por el ATP extracelular produce un incremento de la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  y de ATP desde la microglía, que a su vez activan e incrementan la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> (Takenouchi *et al* 2011) (**Figura 8**). Otros estudios realizados en células microgliales de ratón, describen que los niveles de ARNm del receptor P2Y<sub>2</sub> se encuentran incrementados cuando las células son estimuladas con el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>, lo que incrementa la fagocitosis y degradación del péptido beta amiloide



(A $\beta$ ) (Boucsein *et al* 2003, Kim *et al* 2012, Peterson *et al* 2010). Curiosamente hay trabajos que demuestran que la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> se encuentra disminuida en la corteza parietal de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer y esta pérdida de expresión se encuentra relacionada con la progresión de la patología (Lai *et al* 2008). En este contexto, cabe destacar que utilizando un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer, Ajit y colaboradores describieron que el ratón transgénico TgCRND8 presentaba unos niveles elevados de ARNm de P2Y<sub>2</sub> a los 2 meses de edad y sin embargo, dichos niveles se reducen entre los 6-12 meses de edad. Por otro lado, cuando el ratón TgCRND8 tenía completamente delecionado el receptor P2Y<sub>2</sub> se producía una disminución drástica de la vida media del animal a 4-5 semanas. Estas observaciones sugieren que la pérdida del receptor P2Y<sub>2</sub> puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Ajit *et al* 2014).



**Figura 8. Implicación del receptor P2Y<sub>2</sub> en procesos neuroinflamatorios.** Tanto el daño neuronal como la exposición al péptido A $\beta$  ①, producen la liberación de ATP y UTP ②, agonistas endógenos del receptor P2Y<sub>2</sub>. La activación de dicho receptor provoca la interacción con integrinas ③, que a su vez activa Rho ④ y promueve la regulación del crecimiento de neuritas ⑤. La activación del receptor P2Y<sub>2</sub> por IL-1 $\beta$ , promueve el procesamiento de APP a través de la ruta no-amiloideogénica, a través de ADAM 10/17 ⑥. Por otro lado, el receptor P2Y<sub>2</sub> también produce la transactivación de receptores de factores de crecimiento ⑦ que junto a las integrinas se encargan de regular la migración y proliferación celular. Además, el ATP liberado al espacio extracelular puede activar al receptor P2X7 microglial ⑧, que provoca la liberación de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  y ATP ⑨ que a su vez inducen un aumento en los niveles de ARNm del receptor P2Y<sub>2</sub> tanto en neuronas ⑩ como en microglía ⑪. Por otro lado, la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> en microglía favorece la fagocitosis ⑫ y degradación del péptido A $\beta$  ⑬. Adaptado de (Erb *et al* 2015)



Los astrocitos constituyen entre el 20-40% de todas las células gliales presentes en el cerebro (Verkhratsky & Butt 2013). Sin embargo, el papel fisiológico del receptor P2Y<sub>2</sub> en astrocitos ha sido menos investigado. Bajo condiciones patológicas, los nucleótidos liberados de neuronas dañadas pueden estimular células gliales que se vuelven reactivas, proceso que se conoce comúnmente como astrogliosis reactiva (Rutka *et al* 1997). Esta astrogliosis se caracteriza por un aumento en la proliferación de los astrocitos junto a cambios morfológicos como hipertrofia celular, extensión de las fibras e incremento en la expresión de GFAP (proteína ácida glial fibrilar) (Norton *et al* 1992, Rutka *et al* 1997). Los astrocitos activados son capaces de migrar hacia la zona afectada para formar una cicatriz glial y separar la zona sana de la dañada. También se encargan de secretar citoquinas y quimoquinas, factores de crecimiento, antígenos y moléculas de adhesión celular (McGraw *et al* 2001). Se ha descrito que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> en astrocitos desencadena la transactivación de receptores de factores de crecimiento con el objetivo de incrementar la proliferación glial, una respuesta celular conocida por estar asociada a procesos de neuroinflamación (Weisman *et al* 2005).

Por otro lado, el grupo de Kukulski demostró que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub>, a través de una vía dependiente de RhoA, se encuentra implicado en la regulación de la migración transendotelial (TEM), un proceso activado por el Lipopolisacárido (LPS) que permite la migración de los neutrófilos de los vasos sanguíneos hacia las zonas de infección/inflamación (Kukulski *et al* 2010). Además, se ha descrito que el receptor P2Y<sub>2</sub>, a través de un mecanismo dependiente de TLR4/NF- $\kappa$ B, juega un papel importante en la potenciación de la respuesta inflamatoria inducida por LPS ya que células de macrófagos múridos estimuladas con UTP y LPS indujeron un aumento en los niveles de PGE<sub>2</sub> y NO (Degagne *et al* 2009, Eun *et al* 2014).

Por otro lado, la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> neuronal, a través de la inactivación de la proteína cofilina, promueve el crecimiento de neuritas lo cual es fundamental para el establecimiento de las conexiones sinápticas así como para el mantenimiento de la supervivencia celular (Figge *et al* 2012). Además, en un estudio realizado en neuronas corticales de roedores, se demostró que la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  induce un incremento de expresión de los niveles de ARNm del receptor P2Y<sub>2</sub> en una vía dependiente de I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B (Kong *et al* 2009). Esta expresión incrementada del receptor, promueve la vía  $\alpha$ -secretasa para la degradación de la proteína precursora de amiloide

(APP) con el fin de generar péptidos solubles no-amiloidogénicos (APP $\alpha$ ) a través de ADAM 10/17 (Kong *et al* 2009, Leon-Otegui *et al* 2011) (**Figura 8**).

Considerando los datos anteriormente mencionados, se ha postulado que el receptor P2Y<sub>2</sub> representa una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas. El papel neuroprotector asociado al receptor P2Y<sub>2</sub> se ha observado principalmente bajo condiciones de neuroinflamación, estrés oxidativo y en enfermedades neurodegenerativas (Weisman *et al* 2012a). Normalmente estas situaciones se encuentran asociadas a un aumento de la cantidad de proteínas mal plegadas en el interior celular, hecho relacionado con un mal funcionamiento del Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS) (Dantuma & Lindsten 2010). El UPS es el principal sistema encargado de controlar la proteostasis celular (Kaushik & Cuervo 2015). El hecho de que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> sea vital para mantener la supervivencia celular en condiciones de estrés oxidativo, condición bajo la cual está alterado el UPS (Ahmad *et al* 2004), nos hizo pensar que tal vez el papel neuroprotector asociado al receptor P2Y<sub>2</sub> fuera debido a su capacidad de regular, de alguna manera, la actividad del UPS.

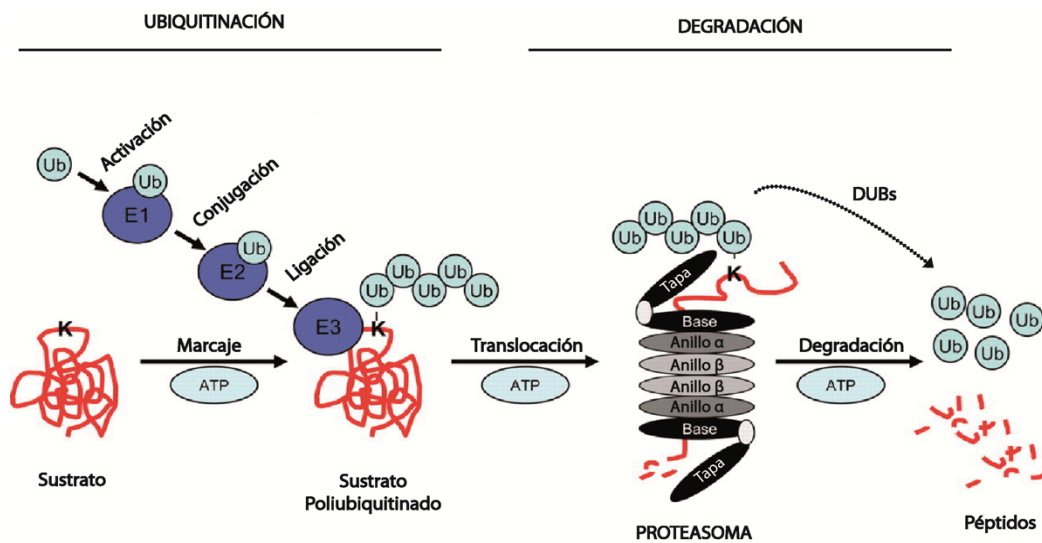
## 2. EL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASOMA

El sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS, del inglés *Ubiquitin-Proteasome System*) se encarga de la degradación de la mayoría de las proteínas intracelulares, de una manera específica y selectiva, tanto en el citoplasma como en el núcleo. Desempeña un papel especialmente importante en la degradación de proteínas dañadas, mal plegadas o de vida media muy corta (Hershko & Ciechanover 1998). También se encuentra regulando numerosos procesos biológicos como la progresión del ciclo celular, reparación de ADN, apoptosis, respuesta inmune, rutas de transducción, transcripción, metabolismo y control de calidad de proteínas (Hochrainer & Lipp 2007).

En la degradación de proteínas vía UPS pueden diferenciarse claramente dos etapas: primero se produce la conjugación de varias moléculas de Ubiquitina (Ub) con el sustrato, mediante la acción coordinada de tres enzimas, para que en una segunda etapa, se produzca la proteólisis del sustrato por el proteasoma (**Figura 9**). La Ub es una proteína muy conservada de 76 aminoácidos y 8,6 KDa, universalmente distribuida entre los eucariotas. La unión covalente de la Ub a las proteínas constituye la señal de

degradación por el proteasoma. En el proceso de unión de la Ub al sustrato intervienen tres tipos de enzimas denominadas E1, E2 y E3. La enzima activadora E1 se encarga de la activación de la Ub mediante la adenilación y posterior creación de un enlace tiol-éster entre un residuo de cisteína del centro activo de la E1 y una glicina del extremo C-terminal de la Ub (E1-S-Ub) en un proceso dependiente de ATP. Estas enzimas presentan una baja especificidad hacia su sustrato y así en el genoma humano sólo se han detectado 16 enzimas E1 (Ardley & Robinson 2005). Por otro lado, la enzima conjugadora E2 es la encargada de transferir la Ub activa de la E1 a la enzima ligasa E3, (Hershko & Ciechanover 1998). Este paso requiere la formación de otro enlace tiol-éster entre la cisteína del centro activo de la E2 y la glicina activada de la Ub (E2-S-Ub), con el consecuente gasto de ATP. En el genoma humano existen 53 enzimas E2 (Ardley & Robinson 2005), lo que demuestra que estas enzimas son más específicas que las enzimas E1. En el caso de la enzima ligasa E3, se han descrito 527 tipos (Ardley & Robinson 2005), lo que indica la alta especificidad en el reconocimiento del sustrato que existe en la degradación por el UPS. Las enzimas E3 reconocen señales de degradación conocidas como degrones, que se encuentran presentes en los sustratos que han de ser degradados por el proteasoma (Laney & Hochstrasser 1999, Pickart 2001).

Sin embargo, no todas las cadenas de poliubiquitina (poliUb) sirven como señal de degradación vía proteasoma. La Ub contiene 7 lisinas en su secuencia (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63), cada una de ellas susceptible de formar una cadena de poliUb (Peng *et al* 2003). Así, la unión de una única molécula de Ub puede actuar modificando la actividad y localización celular del sustrato (Haglund *et al* 2003, Hicke & Dunn 2003, Krappmann & Scheidereit 2005). Si se forma una cadena de poliUb con un mínimo de 4 residuos de Ub unidas por sus lisinas 48, se producirá la señal de degradación por el proteasoma (Hershko & Ciechanover 1998, Imai *et al* 2000, Koegl *et al* 1999, Kuhlbrodt *et al* 2005, Pickart 2001, Thrower *et al* 2000). Sin embargo, si la cadena se genera a través de la lisina 63, la señal no será de degradación, sino que se encontrará implicada en otro tipo de funciones no proteolíticas entre las que se encuentran la activación de la transcripción, activación de proteínas quinasas, reparación y replicación del ADN y tráfico intracelular (Hochrainer & Lipp 2007).

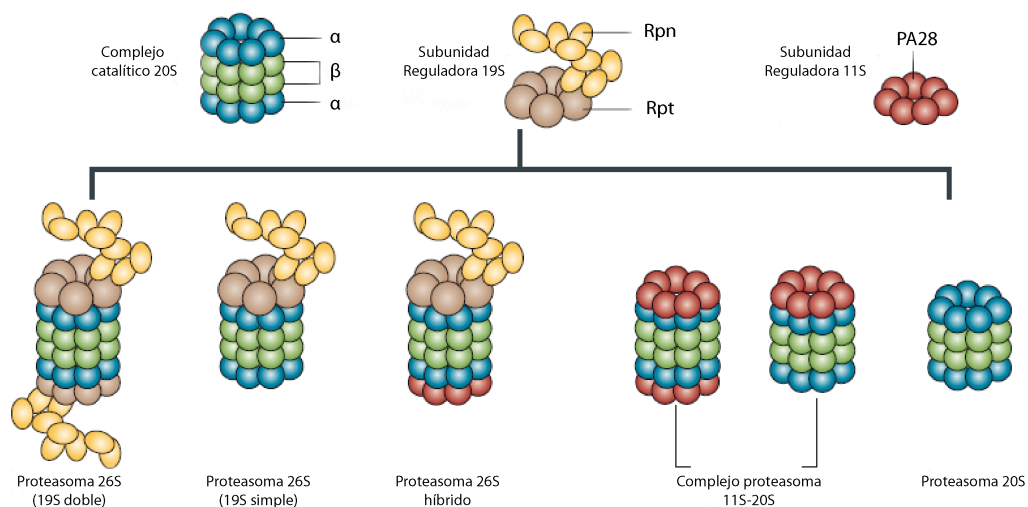


**Figura 9: Degradación de proteínas vía UPS.** En la imagen se distingue una primera etapa de ubiquitinación del sustrato gracias a la acción coordinada de tres enzimas (E1, E2, E3). En la siguiente etapa se produce la degradación del sustrato por el proteasoma 26S, obteniendo como productos fragmentos de 4 a 25 aminoácidos liberados del proteasoma por la subunidad 19S opuesta. Adaptado de (Carrier et al 2010).

Una vez marcado el sustrato para ser degradado, debe alcanzar el proteasoma, bien por difusión o por su propia translocación al núcleo catalítico. El proteasoma, en su conformación 26S, es una gran proteasa multicatalítica de 2.500 KDa formada por dos complejos: el complejo 20S (o núcleo catalítico) y el complejo 19S (o subunidad reguladora). El complejo catalítico 20S, está formado por dos anillos externos  $\alpha$  y dos anillos internos  $\beta$  de 7 subunidades cada uno ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$  y  $\beta 1$ - $\beta 7$ ). Los dos anillos internos  $\beta$  poseen las actividades catalíticas tipo Postglutamil-like ( $\beta 1$ ), tipo Tripsina-like ( $\beta 2$ ) y tipo Quimotripsina-like ( $\beta 5$ ), que cortan después de residuos ácidos, básicos e hidrofóbicos, respectivamente (DeMartino & Slaughter 1999, Groll et al 1997) (**Figura 10**). La entrada a la cámara proteolítica está normalmente bloqueada por los extremos N-terminales de las subunidades  $\alpha$  (Groll et al 2000, Groll et al 1997). Por esta razón, el complejo 20S necesita la ayuda de la subunidad reguladora 19S que se encarga de la unión, deubiquitilación, despliegue y translocación de los sustratos al núcleo catalítico, así como de la apertura del anillo  $\alpha$ . La subunidad reguladora está formada por 19 subunidades repartidas en dos subcomplejos: la base y la tapa. La base está compuesta por 6 subunidades ATPasas (Rpt1-6) y 3 subunidades no-ATPasa (Rpn1, 2 y 13). Las

subunidades ATPasas son necesarias para la apertura del anillo  $\alpha$  y el despliegue del sustrato, para que éste pueda ser introducido dentro del compartimento catalítico y ser degradado. La tapa está compuesta por 9 subunidades no-ATPasa (Rpn3,5-9,11,12,15) que se encargan de reconocer los sustratos ubiquitinados para su degradación. La subunidad Rpn10 conecta la tapa y la base y se encarga de estabilizar el complejo. Tanto el reconocimiento de los sustratos como su despliegue son procesos que necesitan energía metabólica para ser llevados a cabo. Esta energía se obtiene a partir de las actividades ATPasas de las subunidades que la conforman (Murata *et al* 2009).

Además del complejo regulador 19S existen otros complejos activadores menos conocidos, como el complejo 11S (también conocido como PA28/PA26/REG) o el complejo PA200 (Dahlmann 2005, Rechsteiner & Hill 2005). Tanto el complejo 11S (que se describe más detalladamente en el apartado 2.1) como el complejo PA200 no tienen actividad ATPasa y por tanto no despliegan proteínas pero sí son capaces de inducir la apertura del canal del 20S (Cheng 2009).



**Figura 10. Estructura del los diferentes tipos de proteasomas.** Conformación de diferentes tipos de proteasomas en función de su ensamblaje, tipo celular y localización. Adaptado de (Murata *et al* 2009)

Una vez se haya unido el sustrato al proteasoma, la cadena de poliUb debe ser desprendida de la proteína marcada gracias a la acción de las enzimas deubiquitilantes (DUBs) de la subunidad 19S: Ubp6 (Usp14 en humanos), Uch37 y la subunidad Rpn11 de la tapa. Las DUBs se encargan de reducir las cadenas de poliUb a sus

correspondientes monómeros para que sean reutilizadas en el marcaje de otros sustratos (Kawakami *et al* 1999).

## 2.1 Implicación del UPS en situaciones patológicas

Se encuentra ampliamente descrito que el proteasoma está envuelto en numerosos procesos patológicos como pueden ser el cáncer, procesos inflamatorios y enfermedades neurodegenerativas (Dantuma & Bott 2014, Liu *et al* 2015, Qureshi *et al* 2012). El proteasoma es el responsable de la generación de la mayoría de ligandos presentados al Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) que permite la presentación de antígenos intracelulares a los linfocitos T citotóxicos (Basler *et al* 2009, Niedermann *et al* 1999). Células de origen hematopoyético o células estimuladas con agentes proinflamatorios provocan que las subunidades catalíticas constitutivas del proteasoma ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ ) sean reemplazadas por las subunidades catalíticas inducibles de Polipéptidos de Baja Masa Molecular LMP2 ( $\beta 1i$ ) y LMP7 ( $\beta 5i$ ) o por el Complejo-Like Endopeptidasa Multicatalítico MECL-1 ( $\beta 2i$ ) durante la neosíntesis proteasomal, constituyendo el denominado inmunoproteasoma (Kloetzel 2001). Bajo condiciones inflamatorias también se produce la sustitución de la subunidad reguladora 19S por la subunidad 11S (también llamada PA28, formada por dos subunidades PA28 $\alpha$  y PA28 $\beta$ ), que es mucho más pequeña y eficiente para la generación de péptidos antigénicos (Kisselev & Goldberg 2001). La proporción de los diferentes complejos proteasomales 20S o 26S con las subunidades reguladoras 19S o 11S varía dependiendo del tipo celular y de la localización de estos complejos en la célula (**Figura 10**).

Aunque el inmunoproteasoma comparte entre el 60-70% de homología con el proteasoma constitutivo, (Ferrington & Gregerson 2012), ambos difieren en varios aspectos como pueden ser el tiempo de ensamblaje necesario para su biosíntesis o la vida media del complejo. Los beneficios inmunes producidos, debido al reemplazamiento de subunidades constitutivas por subunidades inducibles, son atribuidos a los cambios estructurales en los sitios de unión del sustrato (Huber *et al* 2012) y a la variación del procesamiento de dicho sustrato, optimizando la calidad y cantidad de péptidos generados para la presentación de antígenos al MHC-I (Basler *et al* 2013). Además, el inmunoproteasoma potencia la actividad Quimotripsina-like y Tripsina-like mientras que disminuye la actividad Caspasa-like (Rock & Goldberg 1999,

Tanaka & Kasahara 1998). Generalmente, la expresión del inmunoproteasoma en la mayoría de las células suele ser baja pero aumenta significativamente tras la exposición a estímulos proinflamatorios como Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ), Lipopolisacárido (LPS) o bajo estrés oxidativo (Ferrington & Gregerson 2012, Hisamatsu *et al* 1996).

La endotoxina bacteriana o Lipopolisacárido (LPS) forma parte de las paredes de las bacterias Gram negativas y es ampliamente utilizada por muchos grupos de investigación como modelo de neuroinflamación (Dutta *et al* 2008). El receptor de membrana TLR4, cuyo ligando principal es el LPS, forma parte de la familia de receptores *Toll-Like* que se encargan de la defensa frente a infección microbiana (Medzhitov *et al* 1997). La estimulación del receptor TLR4 por LPS produce la activación de una ruta de señalización que da lugar a la producción de citoquinas, quimioquinas y ROS que provoca la destrucción de patógenos (Dinarello 2000). Muchos de los efectos asociados a la endotoxina se deben a una excesiva producción de citoquinas proinflamatorias liberadas de macrófagos y monocitos activados por LPS. La inflamación crónica o la presencia de estímulos proinflamatorios de manera continuada procedentes de factores ambientales y endógenos (patógenos, agregados proteicos, toxinas...) produce una sobreactivación del sistema neuroinmune que se encuentra relacionada con la progresión de ciertas enfermedades neurodegenerativas (Glass *et al* 2010). Se ha descrito ampliamente que tanto los astrocitos como la microglía expresan el receptor TLR4 (Okun *et al* 2011). Por su parte, las neuronas también expresan TLR4 y pueden responder a LPS liberando citoquinas y quimioquinas, pero la ruta de señalización seguida es distinta a la de células gliales (Leow-Dyke *et al* 2012). Se han realizado algunos estudios que han tratado de relacionar la función del UPS en la respuesta inflamatoria. Uno de estos estudios evaluó el papel del proteasoma 20S en la regulación de la sepsis en un modelo murino de peritonitis inducida por LPS. En dicho estudio se observó que la administración de la endotoxina producía un aumento de la actividad proteolítica del 20S lo cual evidenciaba la importancia del UPS en la regulación de la sepsis (Chai *et al* 2003, Hobler *et al* 1999). En otro estudio se observó un aumento de expresión de los genes de las subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  y PA28 en células HeLa infectadas por *Salmonella typhimurium* (Maksymowych *et al* 1998). Sin embargo, otros investigadores que utilizaban un modelo de atrofia muscular inducida por LPS,



describieron que la administración de la endotoxina producía una disminución drástica de las actividades proteolíticas del 26S acompañada de un incremento de expresión de los genes de las subunidades  $\beta 1$  y Rpt1, lo cual sugería que los componentes del UPS no son regulados de la misma manera en respuesta a un estímulo proinflamatorio (Jamart *et al* 2014).

Existen evidencias tanto celulares como genéticas que apuntan hacia una posible implicación del UPS en la patogenia de determinadas enfermedades neurodegenerativas. Dentro de las evidencias celulares, se ha descrito que, en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas existen agregados proteicos producidos por un desequilibrio entre la síntesis y degradación de proteínas. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer se encuentran los ovillos neurofibrilares formados por filamentos helicoidales compuestos por la proteína Tau hiperfosforilada (Avila 2006); en la enfermedad de Parkinson, encontramos los cuerpos de Lewy cuyo componente principal es la  $\alpha$ -sinucleína (Gandhi & Wood 2005); en todas las enfermedades causadas por expansión de poliQ, por ejemplo en la enfermedad de Huntington, los cuerpos de inclusión están formados por la acumulación de la proteína Huntingtina mutada (Ross & Poirier 2004). Además, en todos los casos, estos cuerpos de inclusión proteicos se tiñen con anticuerpos anti-ubiquitina y anti-proteasoma (Schmitt 2006), lo que sugiere que el UPS se encuentra implicado de una manera directa o indirecta en la patogenia de estas enfermedades. En cuanto a las evidencias genéticas, existen casos particulares de enfermedades neurodegenerativas causadas por la mutación de elementos del UPS. Por ejemplo, se ha descrito que mutaciones en la enzima E3 ligasa Parkina (PARK2), tiene como consecuencia el desarrollo de la forma autosómica recesiva de parkinsonismo (Kitada *et al* 1998), y sin embargo su sobreexpresión reduce los niveles del péptido A $\beta$  en neuronas en cerebros humanos de la enfermedad de Alzheimer (Rosen *et al* 2010). Por otro lado, la expansión de poliQ en la enzima DUB ataxina-3 se encuentra involucrada en el desarrollo de la ataxia espinocerebelosa de tipo 3 (Yamada *et al* 2004) y la inhibición de otra enzima DUB, UCHL1, incrementa significativamente la actividad  $\beta$ -secretasa en la enfermedad de Alzheimer (Zhang *et al* 2012). Además, también se ha descrito que existe una forma mutada de la Ubiquitina, la UBB<sup>+1</sup>, que se expresa en cerebros de pacientes de la enfermedad de Alzheimer y que produce una disminución de la actividad del UPS *in vitro* (Lam *et al* 2000). Aunque inicialmente, los primeros



estudios realizados parecían indicar que la actividad del proteasoma se encontraba disminuida en muestras de pacientes que habían cursado con una enfermedad neurodegenerativa (Bence *et al* 2001), otros grupos no sólo no detectaron disminución en la actividad del proteasoma si no que por el contrario, la encontraron incrementada (Diaz-Hernandez *et al* 2004). También se ha descrito que los niveles de las subunidades inducibles del inmunoproteasoma se encuentran aumentadas en estas situaciones patológicas (Czirr & Wyss-Coray 2012). Por ejemplo, la expresión de las subunidades  $\beta 1i$  y  $\beta 2i$  se encuentra aumentada en muestras de cerebro humano o de ratón de la enfermedad de Huntington o de la enfermedad de Alzheimer (Diaz-Hernandez *et al* 2004, Mishto *et al* 2006a). Sin embargo, las subunidades del inmunoproteasoma también se encuentran incrementadas en tejido de cerebro humano envejecido (Mishto *et al* 2006b) lo que hace plantearse si la elevación de expresión de estas subunidades es una consecuencia del estrés celular producido en el envejecimiento (Shang & Taylor 2011) o es un marcador temprano que permite el progreso de las enfermedades neurodegenerativas.

## *OBJETIVOS*

---

Como se ha mencionado a lo largo de la introducción, el Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS) y el Sistema Purinérgico comparten un papel destacado en numerosos procesos patológicos, lo cual podría indicar que existe cierta relación entre ambos sistemas. Este hecho nos llevó al planteamiento de los siguientes objetivos:

1. Confirmar si existe relación entre la funcionalidad de ambos sistemas, de tal manera que estudiaremos si los nucleótidos extracelulares a través de la activación de alguno de sus receptores específicos pueden modular la actividad del UPS, además de determinar el mecanismo molecular implicado en dicho mecanismo.
2. Determinar si la señalización purinérgica se encuentra implicada en la alteración de la proteostasis celular inducida por un estímulo proinflamatorio o bien la asociada a enfermedades neurodegenerativas, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer.

# *MATERIALES Y MÉTODOS*

---

## 1. MATERIALES

### 1.1 Instrumentación

Los diferentes equipos utilizados durante la realización de las técnicas Bioquímicas y de Biología Molecular que se describen en la presente memoria vienen recogidos en la **Tabla 4**.

*Tabla 4. Relación de los diferentes equipos utilizados*

Técnica	Instrumentación y modelo	Casa Comercial
Cultivos celulares	Microscopio óptico TE-200	Nikon
	Campana flujo laminar horizontal AH-100	Tel-Star
	Incubador 5215-2	Shel-Lab
	Espectrofotómetro Ultrospec III	Pharmacia LKB
Expresión génica	Termociclador Gene Amp2400	Applied Biosystem
	Termociclador de PCR a tiempo real StepOne Plus	Applied Biosystem
	Espectrofotómetro Biophotometer Plus	Eppendorf
	Transiluminador Gel Logic 200 Imagin System	Kodak
Técnicas inmunológicas	Criostato CM1950	Leica
	Microscopio de Fluorescencia TE-200	Nikon
	Cámara DFC310 FX	Leica
	Lupa MZ10F	Leica
	Microscopio confocal TCS SPE	Leica
Western Blot	Sistema de electroforesis Mini-Protean 3	Bio-Rad
	Sistema de transferencia Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
	Equipo de revelado de autoradiografías CP1000	AGFA
	Detector de quimioluminiscencia LAS500	GE Healthcare
Administración intracerebroventricular	Equipo estereotáxico	UNO Anesthesia
	Concentrador de Oxígeno EVERFLO	Respironics
	Fluovac (Adsorción anestesia)	Harvard Apparatus
	Equipo de anestesia	MPB
	Bomba de perfusión	KdsScientific
Medida de la actividad del proteasoma	Fluorímetro LS55	PerkinElmer

### 1.2 Reactivos y productos químicos

En la **Tabla 5** se detallan los compuestos y reactivos utilizados en los ensayos realizados, así como las casas comerciales que los suministraron.

Tabla 5. Relación de los diferentes reactivos utilizados

Proceso experimental	Reactivos	Casa comercial
Cultivos celulares	B27, Solución de antibióticos/antimicóticos, Glutamax, Tripsina, Suero Fetal Bovino	Thermo Fisher Scientific
	AraC, Azul Tripán, DMEM, Neurobasal, DMSO, Piruvato	Sigma-Aldrich
	Poli-L-lisina	Biochrom AG
	Kit de disociación de Papaína	Whorthington
Transfecciones celulares	Lipofectamina 2000	Thermo Fisher Scientific
Técnicas de ADN y ARN	NaOH, Tris-HCl 1M, Agarosa, SYBR-Safe DNA Stain, RNase-Zap, M-MLV RT Reagents, dNTPs	Sigma-Aldrich
	Marcador 100 pb	Thermo Fisher Scientific
	Ultratools polymerase, HotSplit polymerase, MasterMix polymerase, TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, LuminoCt Ready Mix, SpeedTools Total RNA Extraction Kit	Biotoools
Técnicas inmunológicas	p-formaldehído, suero de cabra, suero de burro, suero fetal bovino, Tritón-X-100, BSA	Sigma-Aldrich
Inmunotransferencia	Hepes, EDTA, NaCl, NaF, Ortovanadato sódico, NP40, Membranas de nitrocelulosa, SDS, glicina, Tris, Tween-20, Rojo Ponceau, Leche desnatada en polvo, BSA	Sigma-Aldrich
	Ácido okadaico, Reactivo Bradford, Azul de bromofenol	Merck-Millipore
	Complete (inhibidores de proteasas)	Roche
	Persulfato amónico, Bis-acrilamida 30%, Temed, $\beta$ -mercaptoetanol	BioRad
	Metanol	Carlo-Erba
	Patrones de peso molecular conocido	Thermo Fisher Scientific
	Reactivo ECL Pro	Perkin Elmer
	Películas de autorradiografía, líquido revelador y fijador	AGFA
MTT	Kit de ensayo para MTT	Sigma-Aldrich

Todos los medios y soluciones se prepararon con sales Merck disueltas en agua desionizada de alta calidad y pureza. En general, cualquier sustancia no especificada en las tablas fue proporcionada por Sigma-Aldrich o Merck- Millipore.

### 1.3 Herramientas farmacológicas

En la **Tabla 6** se describen los diferentes fármacos utilizados así como los sustratos empleados para monitorizar la actividad del proteasoma. En la tabla también se indica la concentración empleada y la casa comercial donde se adquirió cada reactivo.

**Tabla 6.** Cuadro resumen de los diferentes fármacos utilizados para el estudio de la señalización purinérgica y del UPS.

	COMPUESTO	[ ] final <i>in vitro</i>	Casa Comercial
Agonistas y antagonistas purinérgicos	ATP	100 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
	UTP	100 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
	Up <sub>4</sub> U	1-1000 $\mu$ M	Inspire Pharmaceutical
	Suramina	10 $\mu$ M	Tocris
	PPADS	50 $\mu$ M	Tocris
Inhibidores quinasas	LY294002	50 $\mu$ M	Merck-Millipore
	GF-109203X	50 $\mu$ M	Merck-Millipore
	SB216763	5 $\mu$ M	Merck-Millipore
	U0126	10 $\mu$ M	Merck-Millipore
	U73122	5 nM	Merck-Millipore
	H89	1 $\mu$ M	Merck-Millipore
	Estaurosporina	7 nM	Merck-Millipore
	PP-2	2 $\mu$ M	Merck-Millipore
Inhibidores proteasoma	MG132	10 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
	Lactacistina	3 $\mu$ g/ $\mu$ L	Sigma-Aldrich
	Epoxomicina	5 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
	PSI	0,1 nM	Merck-Millipore
Endotoxina	LPS	0,3 $\mu$ g/mL	Sigma-Aldrich
Sustratos proteasoma	Succ-LLVY-AMC	100 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
	Z-LLE- $\beta$ -2-NAP	200 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
	BPC-LSTR-AMC	100 $\mu$ M	Sigma-Aldrich

#### 1.4 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección de proteínas mediante técnicas de inmunofluorescencia (IF) o inmunotransferencia se recogen en la **Tabla 7**.

En los ensayos de IF se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios conjugados (Invitrogen): Alexa 488/594/647 anti-ratón o anti-conejo, FITC anti-pollo, Cy3 anti-ratón o anti-conejo, todos a una dilución 1:400, producidos en burro o cabra. Para el marcaje de núcleos se utilizó el marcador de ácidos nucleicos 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen). En los estudios de inmunotransferencia se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP (del inglés *horseradish peroxidase*; peroxidasa de rábano): anti-ratón y anti-conejo producidos en cabra (DAKO), a una dilución 1:5000 y 1:1000, respectivamente.

**Tabla 7. Relación de los distintos anticuerpos primarios utilizados para las técnicas de inmunodetección de proteínas**

Anticuerpos primarios	Especie	Casa comercial (proveedor)	Dilución Inmunotransferencia	Dilución IF
Anti-P2Y <sub>2</sub>	Conejo	Alomone Labs	1/200	1/100
Anti- $\alpha$ -Tubulina	Ratón	Sigma-Aldrich	1/10000	
Anti-GFP	Conejo	Life Technologies	1/1000	1/500
Anti-GFP	Pollo	AVESLab		1/500
Anti-GAPDH	Conejo	Sigma-Aldrich	1/10000	
Anti- $\beta$ -Actina	Ratón	Sigma-Aldrich	1/10000	
Anti-p-ERK1/2	Ratón	Sta Cruz Biotechnology	1/1000	
Anti-ERK-2	Ratón	Sta Cruz Biotechnology	1/1000	
Anti- $\beta$ 1	Ratón	Enzo Life Sciences	1/1000	
Anti- $\beta$ 2	Ratón	Enzo Life Sciences	1/1000	
Anti- $\beta$ 5	Conejo	Enzo Life Sciences	1/1000	1/1000
Anti- LMP2	Ratón	Enzo Life Sciences	1/1000	
Anti-MECL-1	Conejo	Enzo Life Sciences	1/1000	
Anti-LMP7	Ratón	Enzo Life Sciences	1/1000	1/1000
Anti-Rpn12	Ratón	Enzo Life Sciences	1/1000	
Anti-Rpt3	Conejo	Enzo Life Sciences	1/1000	
Anti-CORE 20S	Conejo	Enzo Life Sciences	1/1000	
Anti-FK2	Ratón	Enzo Life Sciences	1/2000	
Anti-Iba1	Conejo	Wako		1/300
Anti-NeuN	Ratón	Merck-Millipore		1/100
Anti-GFAP	Ratón	Sta Cruz Biotechnology	1/1000	1/200
Anti- $\beta$ -III-Tubulina	Ratón	Sigma-Aldrich		1/1000
Anti-IgG Biotinilado	Ratón	ThermoFisher		1/500
Anti-IgG Biotinilado	Conejo	ThermoFisher		1/500
Anti- $\beta$ -amiloide, Wo2	Ratón	Merck-Millipore		1/500

### 1.5 Oligonucleótidos

Para el genotipado de ratones transgénicos carentes de la proteína P2Y<sub>2</sub>, se utilizaron los oligonucleótidos A, B y C que se muestran en la **Tabla 8**, que amplifican secuencias de 414 pares de bases (pb) de tamaño para el ratón silvestre y 598 pb para el homocigoto. Para el genotipado de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP se utilizaron los oligonucleótidos D y E donde se obtuvieron secuencias de 300 pb de tamaño. En el caso de los ratones J20, se emplearon los oligonucleótidos F y G, que amplificaban secuencias de 360 pb de tamaño. En la **Tabla 9** se muestran los oligonucleótidos empleados para la amplificación por RT-qPCR del reportero Ub-GFP.



**Tabla 8. Secuencias de oligonucleótidos y protocolos de amplificación utilizados para el genotipado de ratones carentes de la proteína P2Y<sub>2</sub>, ratón Ub<sup>G76V</sup>-GFP y ratón J20.** Los números entre paréntesis indican el número de ciclos. El tiempo de duración de cada paso viene expresado en minutos (min) o segundos (seg).

Oligonucleótidos	Secuencia	Protocolo de Amplificación		
<b>P2Y<sub>2</sub></b>	<b>A:</b> 5'-GCCACCCCGGCGGGCATAAC-3'	(1) 94°C 3 min	(40) 94°C 30 seg 69°C 1 min 72°C 1 min	(1)72°C 2 min
	<b>B:</b> 5'-AGGGGGACGAACTGGGATAC-3'			
	<b>C:</b> 5'-AAATGCCTGCTCTTTACTGAAGG-3'			
<b>GFP</b>	<b>D:</b> 5'-CCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGC-3'	(1) 94°C 5 min	(40) 94°C 30 seg 60°C 45 seg 72°C 45 seg	(1)72°C 10min
	<b>E:</b> 5'-CGGCGAGCTGCACGCTGCGTCCTC-3'			
<b>J20</b>	<b>F:</b> 5'-GGTGAGTTTGTAAGTGATGCC-3'	(1) 94°C 3 min	(40) 94°C 30 seg 60°C 45seg 72°C 45 seg	(1)72°C 10min
	<b>G:</b> 5'-TCTTCTTCTTCCACCTCAGC-3'			

**Tabla 9. Secuencias de oligonucleótidos y protocolos de amplificación utilizados para la amplificación del reportero Ub-GFP.** Los números entre paréntesis indican el número de ciclos. El tiempo de duración de cada paso viene expresado en minutos (min) o segundos (seg).

Oligonucleótidos	Secuencia	Protocolo de Amplificación		
<b>UbGFP</b>	<b>Fw:</b> 5'-TGCACCTGGTACTCCGTCT-3'	(1) 94°C 5 min	(40) 94°C 30 seg 60°C 30 seg 72°C 30 seg	(1) 72°C 7 min
	<b>Rv:</b> 5'-TCCAGCTCGACCAGGATG-3'			

## 1.6 Material biológico

### 1.6.1 Muestras humanas

Las muestras *postmortem* procedentes de la corteza de pacientes diagnosticados de la enfermedad de Alzheimer fueron cedidas amablemente por el Dr. Félix Hernández del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). Como grupo control se emplearon muestras corticales de pacientes sanos que comprendían la misma franja de edad que las muestras de Alzheimer.

### 1.6.2 Modelos animales

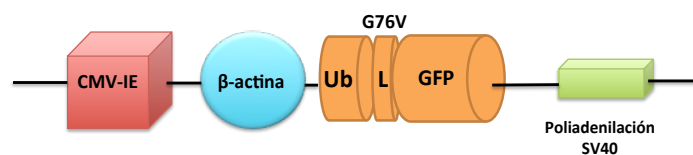
Todos los ratones utilizados en esta Tesis Doctoral se criaron en el animalario de la Facultad de Medicina (CAI) de la Universidad Complutense de Madrid. Se mantuvieron de cuatro a cinco ratones por jaula, con comida y agua disponible *ad libitum*, en un ambiente con temperatura controlada y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los procedimientos experimentales fueron realizados en la Universidad Complutense de

Madrid de acuerdo con las normativas europea y española (86/609/CEE; RD1201/2005), siguiendo las pautas indicadas por el Consejo Internacional de Animales de Laboratorio (ICLAS) y bajo el visto bueno de la CAM (ES280790000086).

Los modelos animales utilizados fueron los siguientes: ratones silvestres, ratones transgénicos reporteros de la actividad del UPS cedidos amablemente por el Dr. J.J Lucas, ratones transgénicos carentes de la proteína P2Y<sub>2</sub> y ratones transgénicos modelo de la enfermedad de Alzheimer (J20) de *Jackson Laboratory*, todos procedentes de la cepa C57BL/6. A continuación, se realiza una descripción detallada de cada modelo animal.

#### **1.6.2.1 Ratón reportero de la actividad del UPS (ratón Ub<sup>G76V</sup>-GFP)**

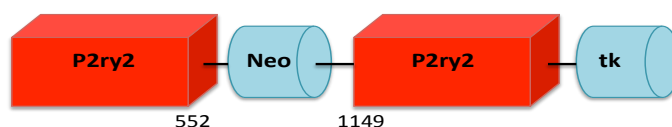
Este ratón expresa la Ubiquitina (Ub) fusionada a la proteína GFP en su extremo N-terminal. La Ub actúa como una señal de degradación de tipo UFD (del Inglés *Ubiquitin Fusion Degradation*) y actúa como aceptora de cadenas de poliUbiquitina (a través de su K48 o, de forma menos habitual, K29). Además, la Ub presenta una mutación G76V en su último aminoácido que previene la desubiquitilación de la GFP por las enzimas desubiquitilantes (DUB) (Dantuma *et al* 2000, Lindsten & Dantuma 2003). Por tanto, al tener unida la primera Ub de forma irreversible a la GFP, la proteína marcada sólo puede seguir el camino a la degradación. La expresión de esta proteína reportera está bajo el control del promotor ubicuo de la  $\beta$ -actina y del activador del *Citomegalovirus* “immediate-early” (CMV-IE) (**Figura 11**). Existen dos líneas múridas que expresan este reportero, las líneas 1 y 2, ambas procedentes de dos fundadores distintos obtenidos a partir de la microinyección de la construcción en oocitos fertilizados. En los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral se utilizaron ratones de la línea 1 (ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP, también denominados ratones U1).



**Figura 11 Representación esquemática de la construcción insertada en el ratón Ub<sup>G76V</sup>-GFP.** Construcción bajo el control del promotor ubicuo  $\beta$ -actina. El transgen contiene el activador del citomegalovirus (CMV) y la proteína GFP con una molécula de Ub unida a su extremo N-terminal cuyo último aminoácido ha sido mutado (G76V) para evitar que sea eliminada por las enzimas deubiquitilantes

### 1.6.2.2 Ratón transgénico carente de la proteína P2Y<sub>2</sub>

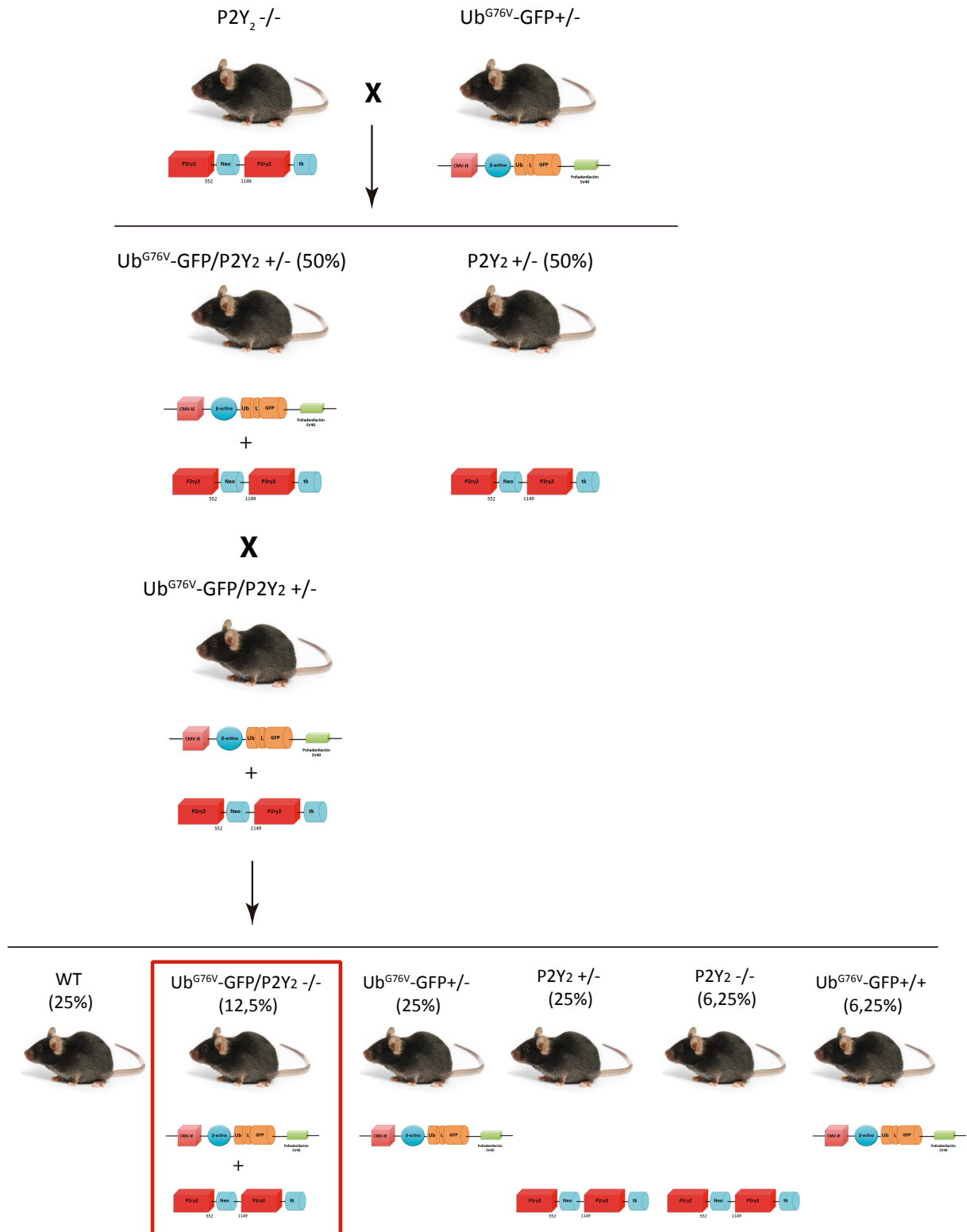
Este modelo transgénico carente de la proteína P2Y<sub>2</sub> (P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>) posee deletcionada la región comprendida entre los nucleótidos 552 a 1149 del receptor P2Y<sub>2</sub> e insertado, mediante recombinación homóloga, el gen de resistencia a Neomicina y el gen de Timidina Quinasa del Virus del Herpes Simple (**Figura 12**). Los ratones en homocigosis son viables, fértiles, de tamaño normal y no presentan anomalías físicas o de comportamiento descritas. No obstante, son más susceptibles a infección por *Pseudomonas aeruginosa* y presentan una pérdida de sensibilidad a la nocicepción térmica y a capsaicina (Homolya *et al* 1999).



**Figura 12:** Representación esquemática de la construcción insertada en la línea transgénica para el receptor P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>. Entre los pares de bases 552 y 1149 se insertan el gen de resistencia a Neomicina y el gen de Timidina Quinasa para el Virus del Herpes Simple impidiendo la funcionalidad del receptor

### 1.6.2.3 Ratón doble transgénico carente de la proteína P2Y<sub>2</sub> con expresión del reportero de la actividad del UPS

Para los experimentos que estudiaran la actividad del UPS en ausencia de expresión del receptor P2Y<sub>2</sub>, se generó el ratón doble transgénico (Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>) mediante el cruce de los ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> y de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tal y como se muestra en la **Figura 13**. Por tanto este ratón no expresará el receptor P2Y<sub>2</sub> pero sí expresará la GFP como reportero del UPS. La frecuencia de obtención de estos animales es del 12,5%.



**Figura 13. Cruces realizados para la obtención del ratón experimental doble transgénico  $Ub^{G76V}\text{-GFP}/P2Y_2^{-/-}$ .** Se realizó un primer cruce entre ratones homocigotos  $P2Y_2^{-/-}$  y ratones heterocigotos  $Ub^{G76V}\text{-GFP}$ . Se obtuvo una descendencia del 50% de heterocigotos para ambos genotipos y un 50% de heterocigotos  $P2Y_2$ . Finalmente, se realizó un segundo cruce entre ratones heterocigotos de ambos genotipos para obtener el ratón doble transgénico reportero del UPS y carente del receptor  $P2Y_2$ .

#### **1.6.2.4 Ratón transgénico modelo de la enfermedad de Alzheimer (J20)**

Este ratón transgénico modelo de la enfermedad de Alzheimer sobreexpresa la Proteína Precursora de Amiloide humana (APP<sub>h</sub>) bajo el promotor PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), con dos mutaciones asociadas a la enfermedad de Alzheimer familiar: la mutación Sueca (K670N/M671L) e Indiana (V717F). Los ratones heterocigotos expresan el producto del transgen en neuronas, siendo detectados los niveles más altos en el neocórtex e hipocampo. Entre los 5 y 7 meses de edad se produce el desarrollo de las placas de  $\beta$ -amiloide (Mucke *et al* 2000). Estos ratones no desarrollan ovillos neurofibrilares y presentan déficits en la memoria espacial (Wright *et al* 2013) y cambios en la plasticidad sináptica (Saganich *et al* 2006).

#### **1.6.2.5 Ratón doble transgénico modelo de la enfermedad de Alzheimer con expresión del reportero de la actividad del UPS (Ub<sup>G76V</sup>-GFP/J20).**

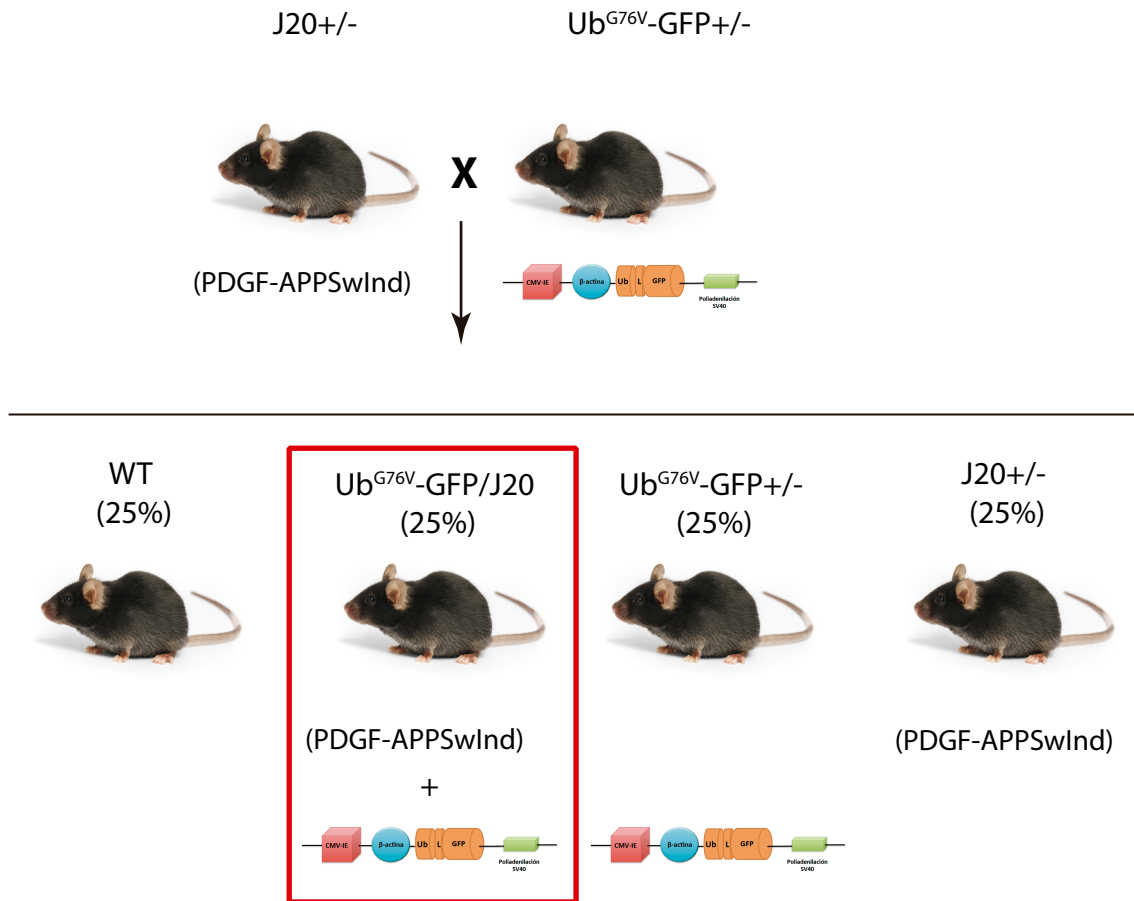
Para los experimentos que analizaran la actividad del UPS en una situación patológica como la enfermedad de Alzheimer, se generó el ratón doble transgénico Ub<sup>G76V</sup>-GFP/J20 mediante el cruce de los ratones J20 y de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP, ambos heterocigotos, tal y como se muestra en la **Figura 14**. Por tanto, este ratón sobreexpresa la APP<sub>h</sub> y expresa la GFP como reportero del UPS. La frecuencia de obtención de estos animales fue del 25%.

### **1.6.3 Modelos celulares**

#### **1.6.3.1 Aislamiento y cultivo de neuronas de hipocampo**

Las neuronas de hipocampo se obtuvieron a partir de ratones silvestres C57BL/6 a día postnatal (P) 0-1 o en estado embrionario (E) 18. Los cultivos se realizaron en base al protocolo del kit comercial de disociación de Papaína (Worthington Biochemical Corporation) tal y como se muestra esquemáticamente en la **Figura 15**.

En el caso de cultivos de ratones E18, las hembras gestantes se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los embriones mediante cesárea. Tanto los ratones E18 como los ratones P0-P1, se sumergieron en etanol al 70%, se sacrificaron mediante

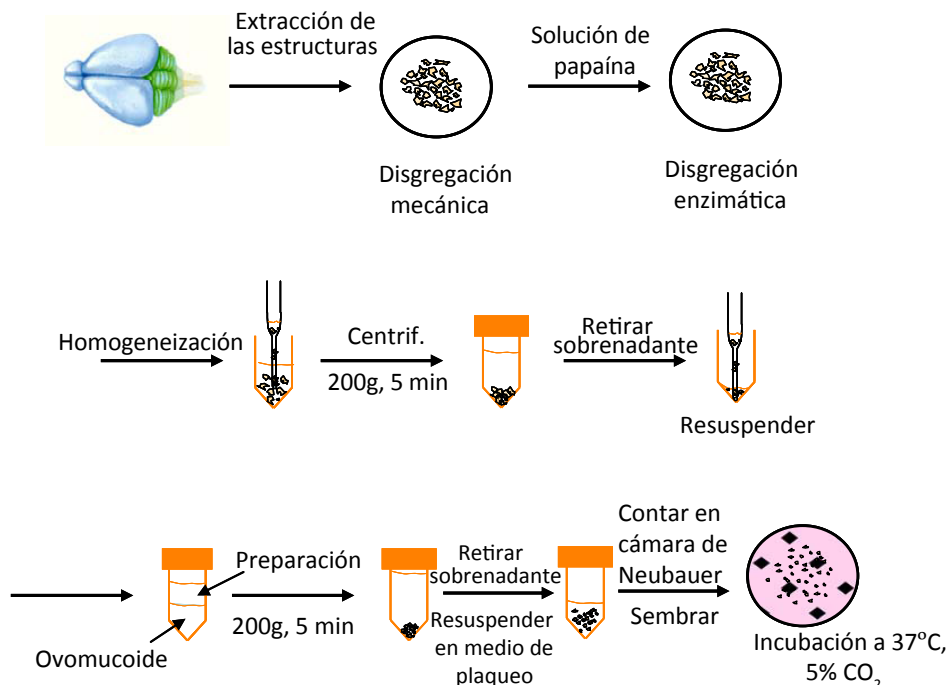


**Figura 14. Cruces realizados para la obtención del ratón experimental doble transgénico  $Ub^{G76V}\text{-GFP}/J20$ .** Se realizó un cruce entre ratones heterocigotos  $J20$  y ratones heterocigotos  $Ub^{G76V}\text{-GFP}$  donde la frecuencia de obtención del ratón doble transgénico reportero del UPS y modelo de la enfermedad de Alzheimer fue del 25%.

decapitación, se extrajo el encéfalo y se lavó con medio Neurobasal estéril. A continuación, se extrajo el hipocampo y se introdujo en una placa con medio Earle's *Balanced Salt Solution* (EBSS) estéril y frío. Una vez la estructura estuviese completamente limpia, se retiró el medio EBSS y se procedió a su disgregación mecánica con ayuda de cuchillas estériles. Inmediatamente después, se disoció con la solución de papaína (preparada de acuerdo a las instrucciones del kit) durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente, los fragmentos se recogieron con una pipeta Pasteur estéril siliconizada, se pasaron a un tubo cónico de centrifuga y se finalizó la disgregación con 15 pases a través de la pipeta Pasteur hasta conseguir una mezcla homogénea, la cual se centrifugó 5 minutos a 37°C y 200 x g. El sedimento resultante se resuspendió en una solución de ovomucoide, albúmina y ADNasa y se colocó sobre la solución de inhibición

(ovomucoide y albúmina). Se centrifugó de nuevo la mezcla 5 minutos a 37°C y 200 x g. El sedimento resultante se resuspendió en el medio de siembra compuesto por Neurobasal suplementado con FBS al 10%, penicilina (10 U/ml), estreptomicina (10 µg/ml), glutamina 0,5 mM y piruvato 1 mM.

La viabilidad celular se determinó por exclusión del colorante vital Azul Tripán y el recuento de células se realizó en una cámara de Neubauer. Tras el recuento, las células se diluyeron en medio de siembra y se sembraron a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup>. A las 3 horas se cambió el medio de las células a un medio de cultivo compuesto por Neurobasal suplementado con 10 U/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomicina, 0,5 mM de glutamina, 1 mM de piruvato y B27 al 1% para permitir la diferenciación y el crecimiento neuronal. Tras 24 horas post-cultivo, se añadió β-D-arabinofuranósido (AraC) a una concentración final de 10 µM para eliminar la proliferación glial y se cambió el medio del cultivo cada 2-3 días. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador de atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> al 5%, saturada de humedad y a una temperatura constante de 37°C.



**Figura 15.** Esquema del protocolo seguido para la obtención de neuronas, microglía y astrocitos de cerebro de ratón.

En los experimentos con herramientas farmacológicas, las neuronas fueron tratadas a día *in vitro* 7 (DIV 7). Tras 24 horas de tratamiento, las neuronas en cultivo se procesaron para su posterior análisis mediante inmunotransferencia o para la medida de la actividad del proteasoma.

#### ***1.6.3.2 Aislamiento y cultivo de células gliales hipocampales***

Para los cultivos de astrocitos y células microgliales de hipocampo, los ratones silvestres o P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> a estadio P5 fueron sometidos al mismo proceso descrito en el apartado 1.6.3.1, con la única diferencia que tras el recuento, las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM suplementado con FBS al 10%, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de kanamicina y 2,5 µg/ml de anfotericina, y se sembraron en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> de tapón ventilado a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup> por botella. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador de atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> al 5%, saturada de humedad y a una temperatura constante de 37°C durante 12-14 días, reemplazando el medio cada 2-3 días. En estas condiciones de cultivo, las neuronas no sobreviven y sólo crecen células gliales que se dividen hasta alcanzar la confluencia, momento en el que dejan de proliferar.

Para separar ambos linajes, las botellas de cultivo se sometieron a agitación orbital a 250 rpm durante 2 horas a 37°C (agitador orbital CH-4103, INFORS AG). Finalizado el período de agitación, se retiró el medio de cultivo que contenía la microglía y se tripsinizaron los astrocitos adheridos a la superficie de cultivo. Posteriormente, se centrifugaron ambos linajes a 200 x g durante 5 minutos a 37°C, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en el medio de cultivo, se cuantificó el número de células obtenidas y se sembraron a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup> para ser utilizadas durante los 5 días siguientes.

#### ***1.6.3.3 Cultivo de líneas celulares de neuroblastoma mûrido (N2a)***

La línea celular utilizada fue de Neuroblastoma mûrido Neuro-2a (N2a), la cual proviene de un clon establecido por R.J. Klebe y F.H. Ruddle a partir de un tumor



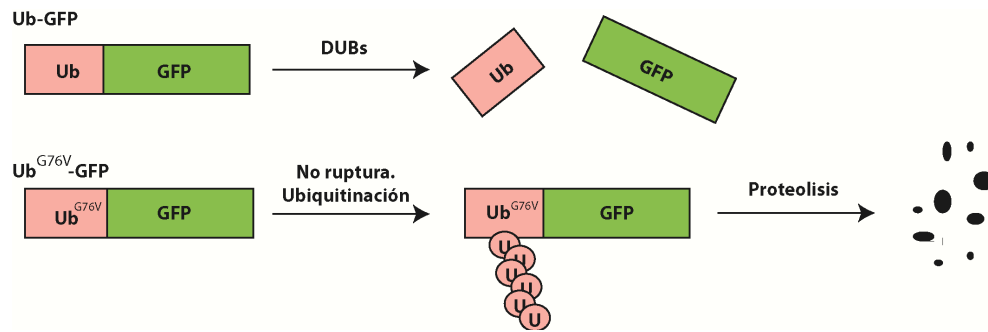
espontáneo de la cepa A de ratón albino (Ruddle et al 1969). Estas células se mantuvieron en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) de alto contenido en glucosa (4500 mg/L glucosa), suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado (FBS<sub>i</sub>), GlutaMAX™ (L-alanil-L-glutamina), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina en atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> al 5%, saturada de humedad y a una temperatura constante de 37°C. Para el mantenimiento de la línea celular se dieron pases cada dos o tres días, tripsinizando las células crecidas en las botellas de cultivo y, tras recoger las células y centrifugar, se sembraron en pases 1:3-1:6 en botellas T-75 según las necesidades.

## 2 MÉTODOS

### 2.1 Transfecciones celulares

Las transfecciones celulares se realizaron utilizando el reactivo catiónico Lipofectamina 2000. Las células N2a se sembraron a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup> y al día siguiente, antes de realizar la transfección, se retiró el antibiótico del medio. Para la transfección se preparó una mezcla de Lipofectamina y DMEM, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, esta mezcla se añadió sobre 4 µg de ADN diluido en DMEM y se dejó incubando durante 20 minutos antes de añadirla a las células. A las 6 horas postransfección se cambió el medio de las células por medio suplementado con FBS<sub>i</sub>. La expresión concomitante de YFP permite identificar el rendimiento de células transfectadas mediante microscopía de fluorescencia. Los rendimientos obtenidos fueron del 70-80%. En el caso de la transfección con los plásmidos para la sobreexpresión y el silenciamiento del receptor P2Y<sub>2</sub>, las células N2a se cotransfectaron con 4 µg de ADN de los plásmidos de sobreexpresión o de interferencia junto con el plásmido Ub<sup>G76V</sup>-YFP. A continuación, se describen las características principales de los plásmidos utilizados en esta Tesis Doctoral:

- Para estudiar la funcionalidad del UPS se utilizaron dos reporteros sustratos del UPS (Ub<sup>G76V</sup>-YFP y GFP-CL1). Lindsten y colaboradores generaron el reportero Ub<sup>G76V</sup>-YFP (construcción ya descrita en el apartado 1.6.2.1, **Figura 16**).



**Figura 16. Construcción Ub-M-GFP y Ub<sup>G76V</sup>-GFP.** La Ubiquitina mutada (G76V) evita la acción de las enzimas desubiquitilantes (DUBs), por tanto la unión a la GFP es irreversible, de manera que la proteína marcada será degradada por el proteasoma.

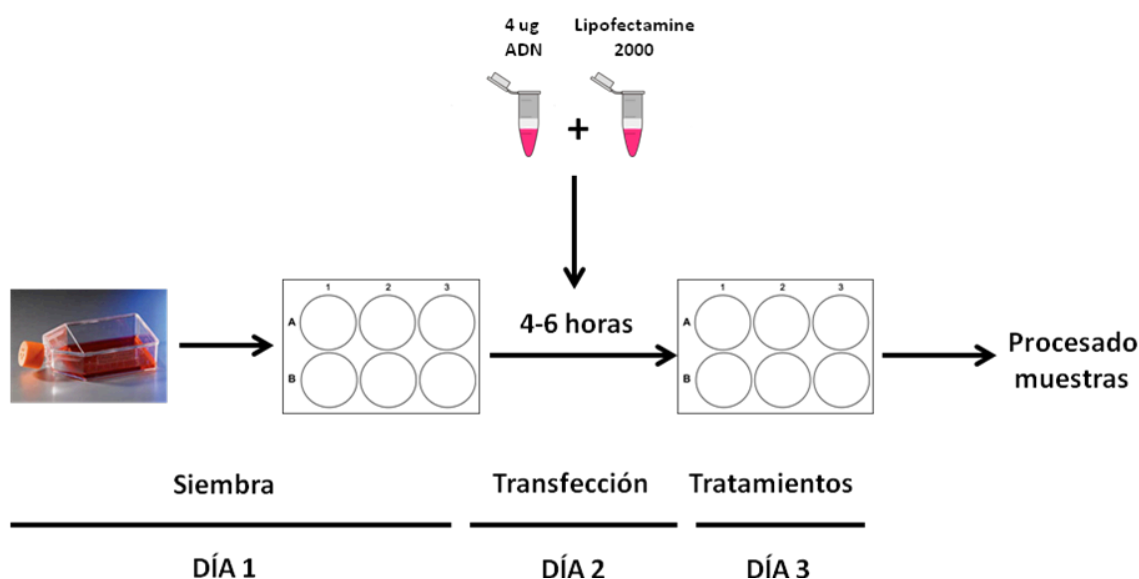
Esta molécula reportera, aunque es rápidamente degradada, mantiene una expresión basal en condiciones normales. Sin embargo, como consecuencia de un aumento de la actividad del UPS, se produce una disminución de los niveles basales de reportero y, por el contrario, se produce un aumento de los niveles de fluorescencia cuando la funcionalidad del UPS se encuentre comprometida. Por otro lado, el degrón GFP-CL1 tiene una secuencia C-terminal que es identificada como señal de degradación por el UPS (Gilon *et al* 1998). Ambas moléculas reporteras responden a tratamientos con varios inhibidores del proteasoma, aumentando su intensidad de fluorescencia hasta 1000 veces (Dantuma & Lindsten 2010, Kessler *et al* 2003). Como control se utilizó la construcción Ub-M-GFP (Dantuma *et al* 2000), una proteína de fusión que no presenta la sustitución G76V de manera que es rápidamente procesada para liberar la Ubiquitina y la GFP.

- La sobreexpresión del receptor P2Y<sub>2</sub> de ratón se realizó a partir de la secuencia de ADN codificante obtenida de la biblioteca *Mammalian Clone Collection* (MMM1013-64398, Dharmacon). El ADN codificante de P2Y<sub>2</sub> fue clonado en el vector comercial de expresión pCMV-SPORT6 (Life Technologies) que contiene la secuencia del promotor del Citomegalovirus (CMV) para su expresión en células de mamífero. EL CMV es un promotor de expresión fuerte, de manera que asegura su correcta expresión en transfecciones transitorias en células de mamífero, pudiendo observar la producción de proteína en las células a partir de las primeras 24 horas postransfección.

- El silenciamiento de la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> se llevó a cabo mediante los *small hairpin RNA* (shARN). Para la expresión de los shARN se utilizó el vector de expresión pSuper.gfp/neo (Oligoengine, Seattle, EEUU), el cual expresa de forma simultánea el shARN de interés y la proteína verde fluorescente GFP, lo que permite la identificación de las células transfectadas.
- Como control de transfección se utilizó una secuencia dirigida contra el ADN codificante de la luciferasa de luciérnaga (psLUC), la cual no está presente en el genoma de las células de mamífero.

## **2.2 Administración de fármacos en cultivos celulares**

Tras 24 horas de la transfección o de la siembra de las células, se procedió a su estimulación con los compuestos indicados en la **Tabla 3**, siguiendo el protocolo representado en la **Figura 17**.



***Figura 17. Procedimiento seguido para la realización de experimentos con cultivos celulares.***

Antes de aplicar los tratamientos y con el fin de detener el ciclo celular, se redujo el porcentaje de suero en el medio de cultivo al 1% en el caso de los cultivos primarios o directamente fue retirado del medio en el caso de la línea celular N2a. Cuando los

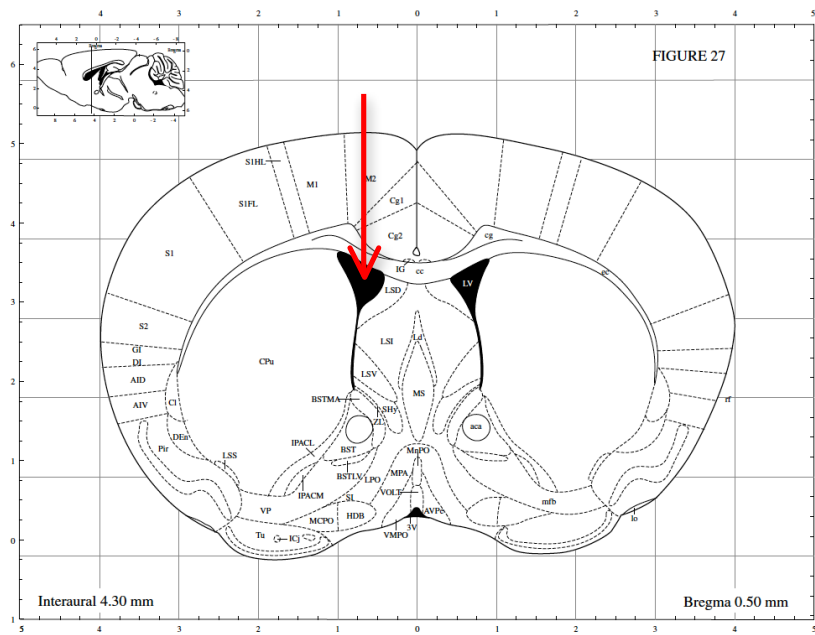
tratamientos combinaron la acción de un inhibidor/antagonista junto con el agonista, se realizó una preincubación durante 20 minutos del inhibidor o antagonista. Los tiempos de estimulación variaron según las necesidades experimentales.

Transcurridos los tiempos de estimulación o preincubación anteriormente indicados, se procedió al procesamiento de los cultivos celulares de la siguiente manera: se retiró en su totalidad el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS a 4°C. A continuación, las células se recogieron en tampón de lisis a 4°C (compuesto por el tampón de lisis NP40 junto al cóctel de inhibidores o por un tampón de lisis específico de la medida de la actividad del proteasoma sin cóctel de inhibidores). El extracto celular se transfirió a un tubo de microfuga donde se mantuvo 1 hora en agitación a 4°C y posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 4°C y 16.000 x g para recoger el sobrenadante que contenía las proteínas citosólicas. Una vez obtenidas las proteínas, se realizó la cuantificación por el método de Bradford.

### **2.3 Inyección intracerebroventricular**

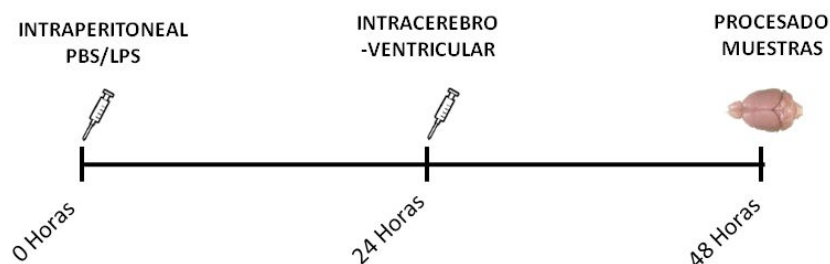
La administración intracerebroventricular (i.c.v) de los diferentes compuestos se realizó mediante cirugía estereotáxica en ratones adultos de 6 meses de edad. Los animales fueron anestesiados con isofluorano (IsoVet®, BRAUN) diluido en oxígeno al 50% y se colocaron en el aparato estereotáxico donde se les realizó una incisión a lo largo de la sutura craneal sagital superior. Se retiró la piel hasta que los puntos de referencia craneales Lambda y Bregma fueron visibles. El ventrículo se marcó utilizando las siguientes coordenadas estereotáxicas relativas a Bregma: antero-posterior -0,5mm, medial-lateral 1mm y dorso-ventral 2,5mm (**Figura 18**).

Con una aguja se realizó en el cráneo una pequeña trepanación en las coordenadas descritas y con una jeringuilla Hamilton se inyectó, en el hemisferio derecho, 2 µL del tratamiento requerido a un flujo constante de 1 µL/min. Tras la administración, la jeringuilla se mantuvo durante 4 minutos en la misma posición (para permitir la difusión del compuesto administrado), y posteriormente se extrajo a una velocidad de 1 mm/minuto. La sutura de la piel se llevó a cabo con un hilo de sutura 6-0 (LorcaMarín, España).



**Figura 18: Inyección intraventricular.** Esquema de una sección coronal del cerebro de un ratón de 6 meses de edad. La flecha roja indica el recorrido de la aguja Hamilton. La cabeza de la flecha indica el punto en el que se ha introducido el tratamiento

El protocolo seguido en las administraciones *in vivo* se muestra en la **Figura 19**. Los procesos experimentales que requerían la administración de Lipopolisacárido (LPS) se llevaron a cabo mediante administración intraperitoneal (24 horas antes de la inyección i.c.v), a una concentración de 5 mg/Kg (Kondo *et al* 2011). Por su parte, los ratones controles fueron tratados con el mismo volumen de la solución vehículo (PBS).



**Figura 19. Protocolo seguido para la administración de los diferentes tratamientos *in vivo***

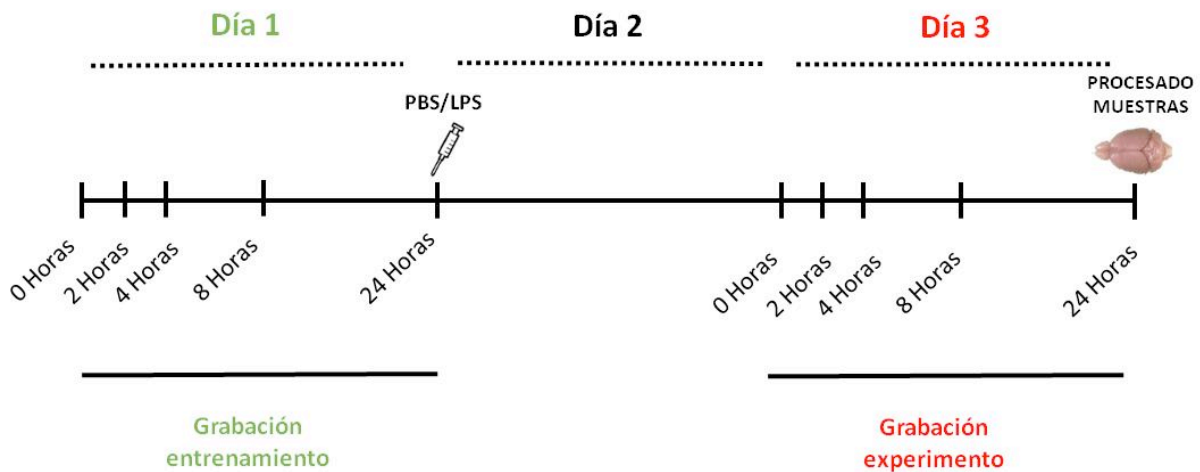
Una vez administrados los tratamientos se procedió a la extracción y procesado de las muestras. Los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO<sub>2</sub> y posterior

decapitación. En el caso donde los cerebros fueron sólo utilizados para técnicas histológicas, el ratón fue perfundido transcárdialmente con PBS y posteriormente con PFA al 4% antes de proceder a la disección de las estructuras. Aquellos cerebros procesados tanto para técnicas histológicas como bioquímicas, se dividieron en los dos hemisferios mediante la realización de un corte longitudinal con un bisturí, donde uno de los hemisferios se fijó por inmersión en PFA al 4% y el otro hemisferio fue diseccionado extrayendo corteza, cerebelo e hipocampo.

Las estructuras se congelaron rápidamente en nieve carbónica, se adicionó tampón de lisis y se disgregó el tejido con un mini póter y varios pases a través de una aguja estéril (diámetro 20G). Tras su completa homogenización, las muestras se centrifugaron a 16.000 x g en microfuga a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante, en el que se encuentran las proteínas citosólicas, se recuperó en un tubo colector y una alícuota de este sobrenadante se reservó para medir la concentración de proteínas siguiendo el método Bradford.

#### **2.4 Experimentos de comportamiento: test de interacción social**

Ratones hembras de ambos genotipos (ratones silvestres y ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>) fueron aislados y manipulados aproximadamente dos minutos cada día durante una semana antes del test para aclimatarse tanto al ambiente como a la manipulación por parte del investigador. 24 horas antes de la administración de los tratamientos, se realizó la grabación del entrenamiento que consistía en introducir, en las jaulas donde se encontraba el sujeto experimental, un ratón hembra joven (sujeto control) de aproximadamente un mes de edad durante 10 minutos. Al día siguiente, se procedió a la administración del vehículo (PBS) o de LPS, y tras 24 horas de los tratamientos se realizó el test comportamental siguiendo las mismas pautas que en el entrenamiento. Tanto el proceso experimental como el análisis de los resultados se realizaron mediante un procedimiento doble ciego. Los resultados fueron expresados como la cantidad de tiempo que el sujeto experimental pasaba investigando (inspección ano-genital, persecución, acicalamiento) al sujeto control. Los datos fueron representados como el porcentaje de variación de tiempo que los ratones interaccionaban comparado con las respectivas medidas basales (entrenamiento). El procedimiento se representa en la **Figura 20**.



*Figura 20. Procedimiento seguido para la realización del test comportamental de interacción social*

## 2.5 Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

### 2.5.1 Genotipado de las diferentes líneas transgénicas

El ADN genómico se extrajo de un fragmento de cola de los animales. Las colas se lisaron, incubándolas a 99°C con NaOH 50 mM durante 30 minutos, o hasta que se degradasen por completo. Para neutralizar la reacción se añadió 50 µL de Tris-HCl 1M pH 8,0 y las muestras se centrifugaron durante 6 minutos a 16.000 x g para separar los restos no digeridos. Posteriormente, se recogió el ADN presente en el sobrenadante para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR para la amplificación de secuencias P2Y<sub>2</sub> se llevó a cabo en un medio que contenía los tres oligonucleótidos A, B y C a una concentración final de 1 µM cada uno, 2 µL de ADN y 1,25 U de *DNA Amplitools HotSplit Master Mix* (Biotools), en un volumen final de 12 µL. Por otro lado, la amplificación de secuencias GFP o J20 se llevó a cabo en un medio que contenía el tampón de la *Taq DNA polimerasa* (10X), la mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) a una concentración 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, la correspondiente pareja de oligonucleótidos a una concentración 0,5 µM cada uno, 2 µL de ADN y 0,25 U de *Ultratools DNA Polymerase* en un volumen final de 20 µL. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador *Gene Amp2400* (Applied Biosystems).

Los oligonucleótidos utilizados y el protocolo de amplificación establecido para cada reacción se muestran en la **Tabla 8**.

La separación de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% conteniendo *DNA SYBR Safe* (Invitrogen), sumergidos en tampón TAE (Tris-borato 40 mM, ácido acético glacial 20  $\mu$ M, EDTA 1 mM pH 8,0). Como marcador de peso molecular se utilizó el patrón de ADN comercial *PCR 100bp Low ladder*. Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron mediante el sistema de captación de imágenes *Gel Logic 200 Imagin System* (Kodak) con exposición a luz ultravioleta.

### **2.5.2 Extracción y cuantificación de ARN total**

Las células en cultivo se sembraron en placas de 35 mm al 80% de confluencia y tras los correspondientes tratamientos se procedió a la extracción y purificación de ARN total siguiendo el protocolo descrito en el kit comercial “*SpeedTools Total RNA Extraction Kit*”. Una vez finalizada la extracción del ARN total, se procedió a la digestión del ADN *in situ* incubando las muestras en presencia de *ADNasa* libre de *ARNasas* durante 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de eliminar el ADN contaminante. Finalizado este tiempo, se inactivó la *ADNasa* y se recuperó la fracción de ARN total altamente purificada. La concentración de ARN se determinó cuantificando la absorbancia a 260 nm de las muestras obtenidas en el espectrofotómetro *Biophotometer Plus*. El grado de pureza del ARN se estimó a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra medida a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), el cual, para una disolución de ARN puro, debe tener un valor igual o muy próximo a 2.

### **2.5.3 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en dos fases. Una primera fase que consistía en la síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir del ARN purificado y una segunda fase en la que la ADN polimerasa amplificaba esta primera cadena de ADN.



La síntesis del ADNc, a partir de 1 µg de ARN total extraído de la muestra correspondiente, se realizó utilizando el enzima transcriptasa inversa del virus de leucemia murina *M-MLV*, 6 µg de oligonucleótidos de secuencia aleatoria y 350 µM de una mezcla de los dNTPs. La reacción se desarrolló durante 90 minutos a 37°C, seguida de una incubación a 70°C durante 15 minutos con el fin de inactivar el enzima.

Para la amplificación de la secuencia Ub-GFP, se llevaron a cabo ensayos de PCR utilizando la ADN polimerasa *AmpliTa qGold*® en forma de mezcla de reacción comercial o “*Master Mix*” (que contiene los dNTPs, el tampón de reacción y la polimerasa), una pareja de oligonucleótidos específicos y 5 µL del ADNc previamente obtenido, en un volumen final de reacción de 25 µL. Los oligonucleótidos utilizados y el protocolo de amplificación establecido para cada reacción se muestran en la **Tabla 6**.

Cada reacción de PCR se realizó en paralelo con un control sin ADNc molde para asegurar la ausencia de contaminaciones cruzadas. Una vez finalizadas las reacciones de PCR, la separación e identificación de los productos de amplificación resultantes se realizó siguiendo el mismo proceso que el descrito en el apartado 2.5.1.

#### **2.5.4 PCR cuantitativa a tiempo real (q-PCR)**

El seguimiento del proceso de amplificación se llevó a cabo mediante el uso del kit de amplificación *LuminoCt qPCR ReadyMix*. Por cada muestra a analizar se preparó la siguiente mezcla: 1,25 µL de las sondas fluorescentes Taqman® marcadas con el fluoróforo FAM en el extremo 5' y el *quencher* NFQ-MGB en el extremo 3', 6,25 µL de agua ultrapura, 12,5 µL de la mezcla *LuminoCt Ready mix* (incluye los dNTPs, tampón de reacción y *JumpStart Taq*® DNA polimerasa), 2,5 µL de ARNt (30 ng/mL) y 0,25 µL de ROX. Por cada muestra se utilizaron 5 µL de ADNc molde por pocillo sobre los que se añadieron 20 µL de la mezcla anterior. La sonda comercial Taqman® empleada para el gen P2Y<sub>2</sub> corresponde al número de catálogo Mm02619978\_s1.

La reacción se desarrolló en un programa de dos pasos que incluía una incubación inicial a 95°C durante 20 segundos para la activación de la polimerasa seguido de 40 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: desnaturalización durante 1 segundo a 95°C e hibridación durante 20 segundos a 60°C.

La cuantificación de los genes se realizó interpolando los valores de Ct de cada muestra con la recta patrón. Para generar dicha recta se hicieron diluciones seriadas a partir del producto amplificado por la PCR a punto final. Como control interno de la cantidad total del ADNc añadida se utilizó el gen de expresión constitutiva GAPDH en todas las muestras obtenidas. Finalmente, los resultados se expresaron como aumento o disminución de la expresión con respecto a la condición control, en ausencia de estimulación.

## **2.6 Inmunotransferencia o *Western Blot***

Los ensayos de inmunotransferencia o *Western Blot* se llevaron a cabo a partir de muestras obtenidas de la línea celular N2a, cultivos celulares de hipocampo y extractos de tejido total. Un volumen del extracto de proteínas (conteniendo entre 5-15 µg de proteínas) se mezcló con un volumen del tampón de carga 5 veces concentrado y cuya composición es la siguiente: 57% (v/v) glicerol, 125 mM Tris-HCl 1 M pH 6,8, 10% (p/v) SDS, 0,5% (p/v) Azul Bromofenol. En estas condiciones las muestras se calentaron a 99°C durante 5 minutos en un calentador multibloque y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida, del porcentaje (p/v) requerido en cada caso, en presencia de SDS. Uno de los pocillos del gel se reservó para una mezcla de patrones de peso molecular conocido. La electroforesis se desarrolló en el sistema mini-Protean 3 (BioRad), a un voltaje constante de 120 voltios, en tampón de electroforesis cuya composición es la siguiente: 25 mM Tris, 200 mM glicina y 0,1% SDS, pH 8,3.

Tras la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman), previamente equilibradas durante 5 minutos en tampón de transferencia en un sistema mini-Trans Blot de BioRad, a una intensidad de 150 mA durante 40 minutos para proteínas de pesos moleculares más bajos o a una intensidad de 230 mA durante 70 minutos para pesos moleculares mayores. La composición del tampón de transferencia fue la siguiente: 192 mM glicina, 25 mM Tris y 20% (v/v) de metanol, pH 8,3.

Finalizada la transferencia, las membranas se tiñeron durante 10 minutos con el colorante rojo Ponceau para comprobar la correcta separación y transferencia de las

proteínas, y se destiñeron mediante lavados con tampón PBS conteniendo 0,1% (v/v) de *Tween*-20 (PBS-*Tween* o solución de lavado).

Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada preparada al 5% o albúmina preparada al 3% en TBS-*Tween*, durante una hora a temperatura ambiente, empleando un agitador orbital. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario preparado en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. El exceso de anticuerpo se lavó con el tampón PBS-*Tween* y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa. Esta incubación se llevó a cabo durante una hora a temperatura ambiente.

El exceso de anticuerpo secundario se lavó con el tampón de lavado y la membrana se reveló incubando 2 minutos utilizando el sistema “*Western Lightning Chemiluminescence Reagent*” (PerkinElmer). Este sistema contiene luminol, que es el sustrato específico para la peroxidasa, y que al oxidarse genera una señal luminiscente que es detectada mediante la exposición autorradiográfica a diferentes tiempos. Para ello se emplearon películas de radiografía Agfa junto a una máquina de revelado de autoradiografías CP1000 Agfa o en un detector de quimioluminiscencia LAS500 (GE Healthcare). Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se indican en el apartado 1.4.

## **2.7 Ensayo de viabilidad celular basado en el metabolismo del MTT**

Este procedimiento experimental permite la determinación de la viabilidad celular en función de la actividad mitocondrial de las células vivas. Se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de romper el anillo de tetrazolio del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolio (que en disolución es amarillo), liberando cristales insolubles de formazán, de color morado. Estos cristales de formazán pueden ser solubilizados en isopropanol y medidos en un espectrofotómetro de manera que cuanto mayor sea el número de células vivas presentes, mayor cantidad de cristales de formazán se formarán y mayor será la absorbancia de la muestra.

Para este ensayo se emplearon células N2a que habían sido sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad de 50.000 células/cm<sup>2</sup>. Tras la incubación con los correspondientes tratamientos durante 24 o 48 horas, se retiró el medio y se añadió

tampón Locke (NaCl 140 mM, KCl 4,7 mM, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, HEPES 10 mM, glucosa 5,5 mM a pH 7,4) al que previamente se le había añadido una solución reconstituída de MTT a una concentración de 1,2 µM, manteniéndose en incubación a 37°C durante 2-3 horas. Tras este paso se añadió tampón de solubilización (TritónX-100 al 10%, HCl 1N al 10%, isopropanol al 80%) en un volumen igual al que teníamos en el pocillo, agitando la placa durante 30-60 minutos en un agitador orbital, hasta que el formazán se solubilice completamente. Como último paso, se rasparon los pocillos para homogeneizar toda la mezcla y se midió la longitud de onda a 570 nm en un espectrofotómetro. Como blanco se empleó una solución de MTT reconstituido en ausencia de células y mezclado con tampón de solubilización. Los datos de absorbancia obtenidos de las muestras control (que no habían sido sometidas a ningún tratamiento), se ajustaron como referencia al 100% de supervivencia, calculando así el porcentaje de viabilidad de las células presente en los pocillos a los que se le habían añadido los diferentes tratamientos.

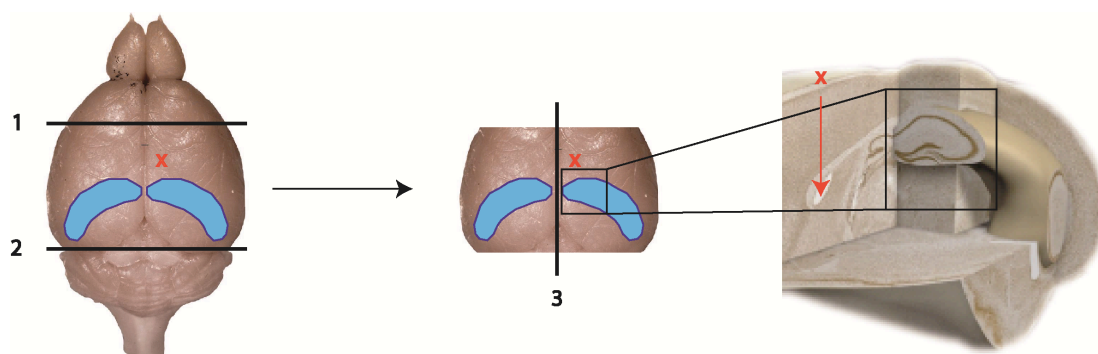
## **2.8 Medida de la actividad enzimática del proteasoma**

Para medir la actividad catalítica del proteasoma se utilizaron sustratos del proteasoma unidos a los fluoróforos Metilcumarina (AMC) o 2-β-Naftilamina (NAP), que en presencia de actividad proteolítica se rompe su unión al sustrato y emiten fluorescencia. Las actividades enzimáticas tipo Quimotripsina-like, Post-glutamyl-like y Tripsina-like se analizaron en lisados de cultivos celulares o en extractos de hipocampo de ratón.

Los ratones transgénicos, previamente inyectados i.c.v, fueron sacrificados mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se procedió a la disección y extracción de una región cúbica del hipocampo ipsilateral que comprendía el volumen más próximo a la zona de administración i.c.v tal y como se muestra en la **Figura 21**.

Tanto las muestras procedentes de cultivos celulares como las procedentes de tejido se lisaron en tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,5 mM ditiotreitól, 5 mM ATP, 0.03% Triton X-100, y 5 mM MgCl<sub>2</sub>) y, en el caso de extractos de tejido, se terminaron de homogeneizar con un mini póter y se resuspendieron con agujas 20G para su completo lisado. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 16.000 x g a 4°C durante

20 minutos y los sobrenadantes resultantes se mantuvieron en hielo mientras se determinaba la concentración de proteína citosólica por el método de Bradford.



**Figura 21. Procedimiento seguido para extracción de hipocampo tras administración intracerebroventricular.** Tras la extracción del encéfalo, se retiran bulbos olfatorios (1) y cerebelo (2). Posteriormente se realiza un corte longitudinal (3) y se disecciona el hemisferio ipsilateral para extraer una región del hipocampo (azul) cercana a la administración de los tratamientos. (X) indica las coordenadas donde se ha realizado la administración de los tratamientos y la flecha roja marca la dirección seguida por la aguja hasta llegar al ventrículo.

Para la determinación de la actividad del proteasoma, se ajustó la concentración de proteína total de los extractos a 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  utilizando como diluyente el mismo tampón de lisis. Todos los extractos se ensayaron por cuadruplicado. Para determinar la actividad tipo Quimotripsina-like se utilizó como sustrato N-Succ-Leu-Leu-Val-Tyr7-Amido-4-metilcumarina (SUCC-LLVY-AMC; Sigma-Aldrich; 100  $\mu\text{M}$ ). Para determinar la actividad tipo Post-glutamil-like se utilizó el sustrato Z-LLE- $\beta$ -2-naftilamina (NAP; Sigma-Aldrich; 200  $\mu\text{M}$ ) y para la actividad tipo Tripsina-like se utilizó el sustrato BOC-LSTR-AMC; (BOC; Sigma-Aldrich; 100  $\mu\text{M}$ ).

La determinación de la actividad del proteasoma se llevó a cabo en reacciones que contenían 6  $\mu\text{g}$  de proteína (procedente de extractos celulares o hipocampales), 32  $\mu\text{L}$  del sustrato a las concentraciones anteriormente indicadas y el tampón de ensayo (100 mM HEPES 0,5 M, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP, 10 mM EGTA 0,5 M), hasta un volumen final de 150  $\mu\text{L}$ . El nivel de actividad inespecífica (causada por otra degradación proteolítica no debida al proteasoma) se obtuvo añadiendo el inhibidor del proteasoma MG132 a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . Las muestras se incubaron durante 60

minutos a 37°C en agitación y en oscuridad para evitar la degradación de los sustratos por la luz. Una vez transcurridos los tiempos de incubación, la reacción se paró añadiendo 1 mL de SDS al 1% y se midió la fluorescencia de las muestras en un fluorímetro con las siguientes condiciones de excitación/emisión: 380/410 nm para sustratos SUCC y BOC y 333/400 nm para sustrato NAP.

## **2.9 Técnicas histológicas**

### **2.9.1 Procesamiento del tejido**

Los hemisferios destinados a técnicas histológicas fueron fijados por inmersión en PFA 4% durante 24 horas. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se sometieron al proceso de crioprotección, que consistió en la inmersión del tejido en una solución de sacarosa al 30% durante 24 horas a 4°C, para evitar la formación de cristales de hielo que pudieran dañar el tejido. Finalmente, se incluyeron en OCT (Optimal Cutting Temperature medium, Tissue-Tek; Sakura) por congelación rápida y se guardaron a -80°C hasta el momento de ser cortados en el criostato. Antes de realizar las secciones histológicas correspondientes, los bloques se dejaron aproximadamente 1 hora en el criostato para que alcanzasen la temperatura del aparato antes del corte. Se realizaron secciones coronales o sagitales de 30 µm de grosor en un criostato Leica y se recogieron sobre una solución de glicol. Las secciones se almacenaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

### **2.9.2 Inmunofluorescencia de secciones de cerebro**

Los cortes seleccionados se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con la solución de bloqueo (BSA 1%, FBS 5%, TritónX-100 0,1% (v/v)) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios (ver **Tabla 3**) a 4°C en cámara húmeda durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron con PBS-BSA 3% y se reveló el marcaje incubando las preparaciones con anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos (ver apartado 1.3) durante una hora a 37°C junto con el marcador de núcleos DAPI. Transcurrido este tiempo, se lavaron con PBS. Por

último, los cubreobjetos se montaron sobre los portaobjetos con un medio de montaje *FluorSave Reagent* (Calbiochem) que reduce el apagamiento de los fluorocromos. Las preparaciones se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su uso.

Para los estudios de colocalización, las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal *TCS SPE* (Leica) y fueron procesadas con el programa informático *ImageJ*. Las imágenes se presentaron con los programas *Adobe PhotoShop* e *Illustrator CS6*.

## **2.10 Análisis estadístico de los datos**

Todos los datos obtenidos se expresan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (s.e.m). Los resultados mostrados en este trabajo corresponden a un mínimo de tres experimentos en duplicado. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa *GraphPad Prism 6*, aplicando el test de la *t de Student* no pareado cuando se comparan dos grupos de valores, o un análisis de la varianza *one way-ANOVA* cuando se comparan varios grupos de valores. Los niveles de significación establecidos han sido:  $p < 0,0001$  diferencia extremadamente significativa (\*\*\*\*);  $p < 0,001$  diferencia muy significativa (\*\*\*);  $p < 0,01$ , diferencia significativa (\*\*);  $p < 0,05$ , diferencia marginalmente significativa (\*). Los niveles superiores a 0,05 se han tomado como no significativos (ns). Para un análisis posterior a la obtención de un ANOVA inferior a 0,05 se utilizó el post-test de Dunnett.

## RESULTADOS

---



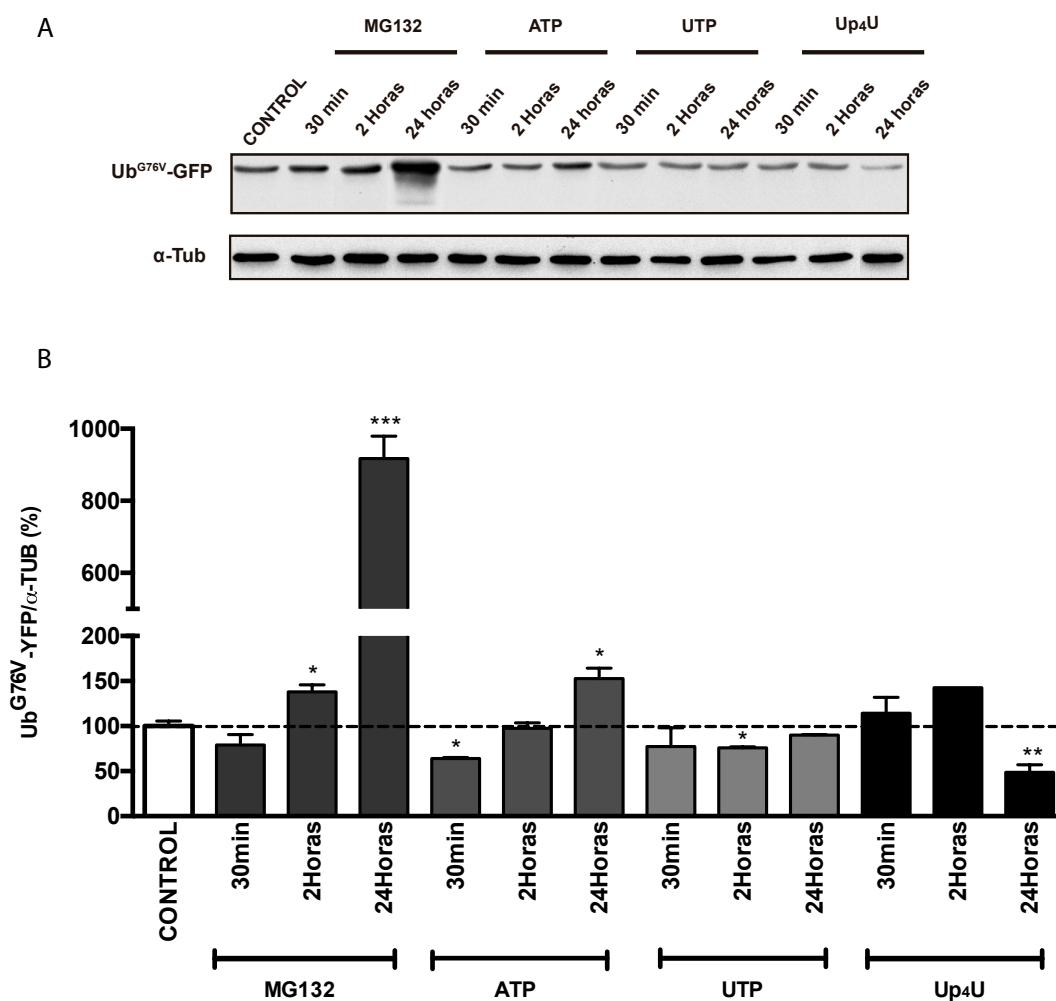
## 1. Aproximación farmacológica *in vitro* para determinar si los receptores purinérgicos metabotrópicos pueden modular la actividad del UPS

Para abordar esta cuestión, inicialmente se realizó una aproximación farmacológica utilizando como modelo biológico la línea celular de Neuroblastoma múrido, N2a. Estas células fueron transfectadas con el plásmido reportero del UPS, Ub<sup>G76V</sup>-YFP (N2a-Ub<sup>G76V</sup>-YFP), descrito en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos. Gracias a la cuantificación de los niveles de dicho reportero, se pueden determinar qué efectos inducen los distintos agonistas y antagonistas de receptores P2Y sobre la actividad del UPS.

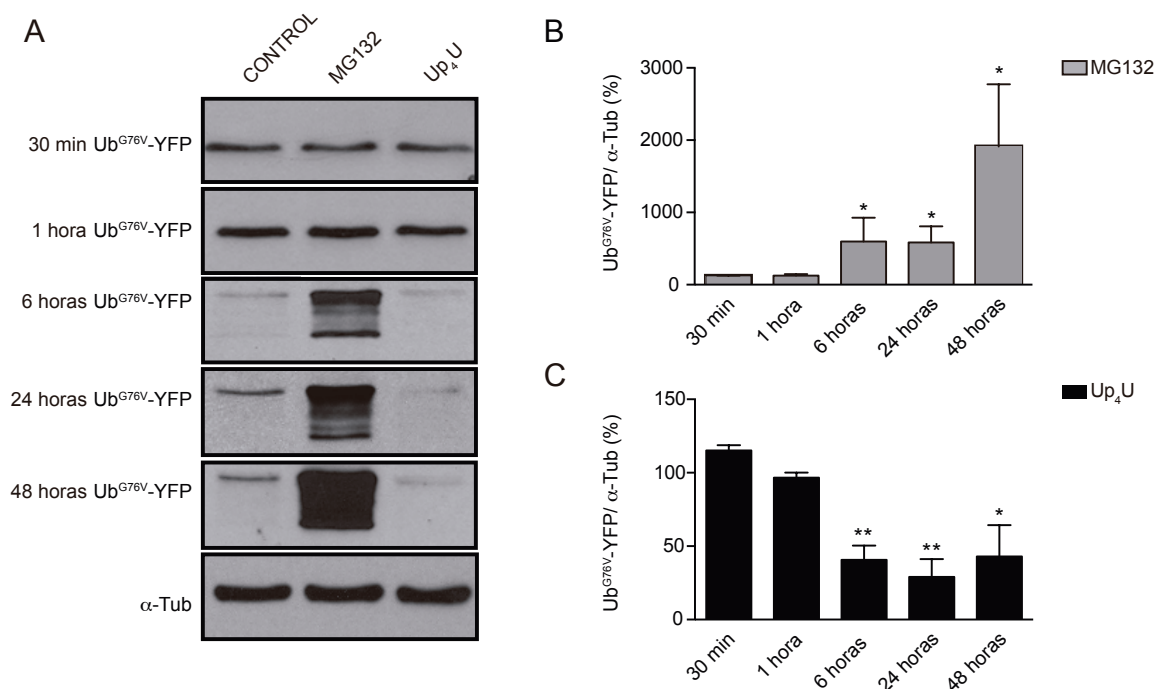
En un primer paso, las células N2a-Ub<sup>G76V</sup>-YFP se trataron con una batería de agonistas de los receptores P2Y como son el ATP (100  $\mu$ M), UTP (100  $\mu$ M) y el dinucleótido Up<sub>4</sub>U (100  $\mu$ M) durante 30 minutos, 2 horas y 24 horas. Como control de la funcionalidad de nuestro sistema, las células fueron tratadas con un inhibidor del proteasoma, el compuesto MG132 (10  $\mu$ M). En la **Figura 22** se muestran los resultados obtenidos mediante esta aproximación farmacológica, en los cuales se observa cómo el ATP (agonista general de receptores P2Y y P2X) produjo un efecto dual: una disminución de los niveles de reportero a tiempos cortos ( $63,96 \pm 1,31\%$ ) y un acúmulo de los mismos a tiempo largos ( $152,8 \pm 11,54\%$ ). Por su parte, el UTP (agonista de los receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub>) produjo una disminución de reportero sostenida en el tiempo, siendo ésta significativa a 2 horas ( $75,83 \pm 1,2\%$ ). Por su parte, el dinucleótido Up<sub>4</sub>U, (agonista específico de los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>), indujo una disminución de reportero significativa sólo a tiempos largos ( $48,67 \pm 8,33\%$ ).

En un segundo paso, se realizó un estudio más detallado del efecto que induce el compuesto Up<sub>4</sub>U sobre la actividad del UPS. Para ello, las células N2a-Ub<sup>G76V</sup>-YFP fueron estimuladas con el dinucleótido Up<sub>4</sub>U (100  $\mu$ M) durante 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 24 horas y 48 horas. Al igual que en los ensayos anteriores, como control de la funcionalidad del sistema, las células fueron tratadas con MG132 (10  $\mu$ M) durante los mismos tiempos.

Los resultados obtenidos se representan en la **Figura 23** y muestran como sólo estimulaciones a tiempo largos (6, 24 y 48 horas) con Up<sub>4</sub>U o MG132 indujeron modificaciones significativas en los niveles de expresión de la proteína reportera Ub<sup>G76V</sup>-YFP. Sin embargo, los efectos producidos por ambos compuestos fueron opuestos: mientras que el inhibidor del proteasoma MG132 produjo un acúmulo significativo de reportero, el dinucleótido Up<sub>4</sub>U indujo una disminución significativa de los niveles de esta proteína.

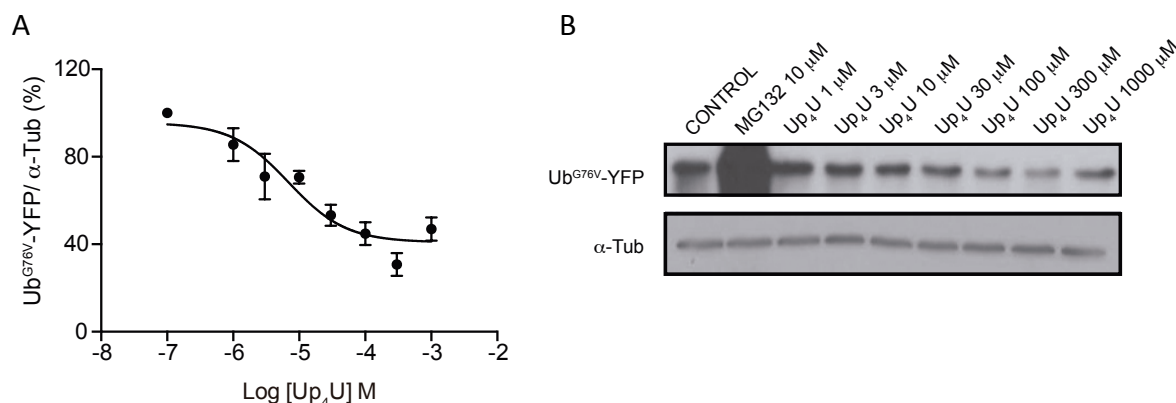


**Figura 22. Efecto de los diferentes agonistas P2Y sobre los niveles de expresión de la proteína reportera Ub<sup>G76V</sup>-YFP en la línea celular N2a a diferentes tiempos.** A) Autoradiograma representativo de los ensayos farmacológicos realizados para medir los niveles de la proteína reportera. B) En la gráfica se muestran los niveles de Ub<sup>G76V</sup>-YFP (%) tras los tratamientos realizados. Como control de carga se utilizó la proteína α-Tub. Los datos se representan como el porcentaje de variación de los niveles de reportero respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de reportero antes de la estimulación con los agonistas P2Y. Todos los resultados corresponden a la media ± s.e.m de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$



**Figura 23.** Variaciones de los niveles de expresión de la proteína reportera Ub<sup>G76V</sup>-YFP producidos por el inhibidor del proteasoma MG132 o el dinucleótido Up<sub>4</sub>U a diferentes tiempos. A) Autoradiograma representativo de los ensayos farmacológicos realizados para medir los niveles de la proteína reportera. B) Cuantificación del efecto del inhibidor del proteasoma MG132 sobre los niveles de reportero a diferentes tiempos. C) Cuantificación del efecto del dinucleótido Up<sub>4</sub>U sobre los niveles de reportero a diferentes tiempos. Como control de carga se utilizó la proteína α-Tub. Los datos se representan como el porcentaje de variación de los niveles de reportero respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de reportero detectados antes de las estimulaciones. Todos los resultados corresponden a la media ± sem de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

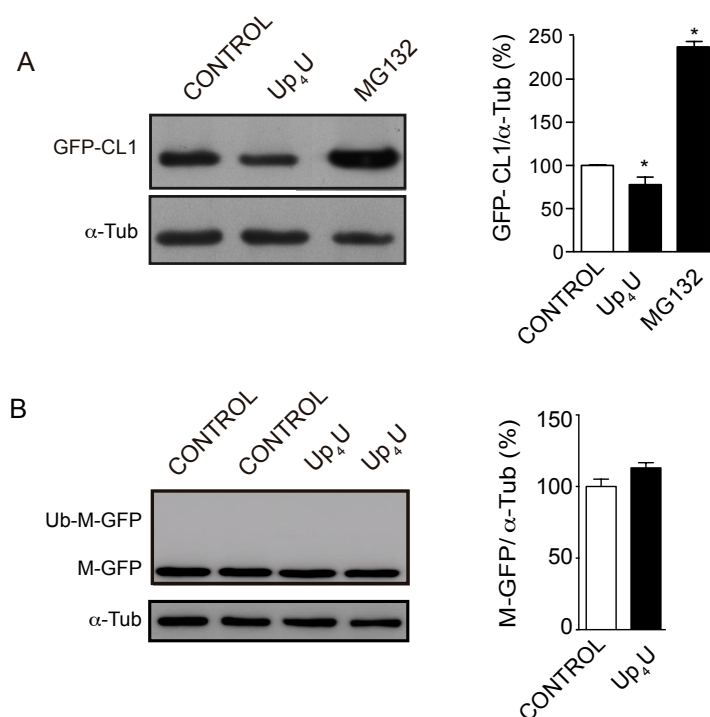
Basándonos en los resultados anteriores, decidimos realizar un análisis dosis-respuesta con el agonista Up<sub>4</sub>U. Para este estudio, se fijó un tiempo de estimulación de 24 horas. En la **Figura 24** observamos que dicho compuesto provocó una disminución de los niveles de reportero de manera dosis-dependiente, obteniéndose un valor de pIC<sub>50</sub> de  $-5,15 \pm 0,46$  M.



**Figura 24. Curva dosis-respuesta del dinucleótido Up<sub>4</sub>U sobre los niveles de la proteína reportera Ub<sup>G76V</sup>-YFP.** A) El dinucleótido Up<sub>4</sub>U fue testado en un rango de concentraciones de entre 1 μM y 1mM. Los datos se representan como el porcentaje de disminución de los niveles de reportero respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de reportero antes de la estimulación con el agonista Up<sub>4</sub>U. B) Autoradiograma representativo del efecto del agonista Up<sub>4</sub>U sobre los niveles de reportero a distintas concentraciones. Como control de carga se utilizó la proteína α-Tub. Todos los resultados corresponden a la media ± s.e.m de 3 experimentos independientes.

## 2. El dinucleótido Up<sub>4</sub>U produce un incremento en la actividad del UPS

Con el fin de validar los resultados obtenidos mediante el empleo del reportero Ub<sup>G76V</sup>-YFP, se decidió utilizar otra molécula reportera que también es capaz de monitorizar la actividad del UPS, el degrón GFP-CL1 (Gilon *et al* 1998). Este degrón, descrito en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos, también actúa como una señal de degradación para el proteasoma. Aunque inicialmente ambos reporteros, Ub<sup>G76V</sup>-YFP y GFP-CL1, fueron diseñados para detectar disminuciones de la actividad del UPS, varios trabajos han confirmado que ambas moléculas también son capaces de detectar incrementos en la actividad del UPS (Lindsten & Dantuma 2003, Vilchez *et al* 2012). En la **Figura 25A** se muestra como las células transfectadas con GFP-CL1 y estimuladas durante 24 horas con Up<sub>4</sub>U 100 μM presentaban una disminución significativa de la proteína reportera ( $77,82 \pm 8,75\%$ ), respecto a los niveles detectados en aquellas células tratadas con la solución vehículo. Por el contrario, cuando las células fueron ensayadas con el compuesto MG132 10 μM se produjo un importante acúmulo de reportero ( $237,48 \pm 7,57\%$ ).



**Figura 25.** Estudio de la actividad del UPS mediante el empleo de diferentes reporteros. A) Autoradiogramas representativos de la detección de la proteína GFP-CL1 obtenidos de células tratadas con Up<sub>4</sub>U o MG132 junto a su correspondiente cuantificación. B) Autoradiogramas representativos de la detección de la proteína Ub-M-GFP obtenidos de células tratadas con Up<sub>4</sub>U o MG132 junto a su correspondiente cuantificación. Como control de carga se utilizó la proteína α-Tub. Los datos se representan como el porcentaje de variación de los niveles de reportero respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de reportero antes de la estimulación con los tratamientos. Todos los resultados corresponden a la media  $\pm$  s.e.m de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$

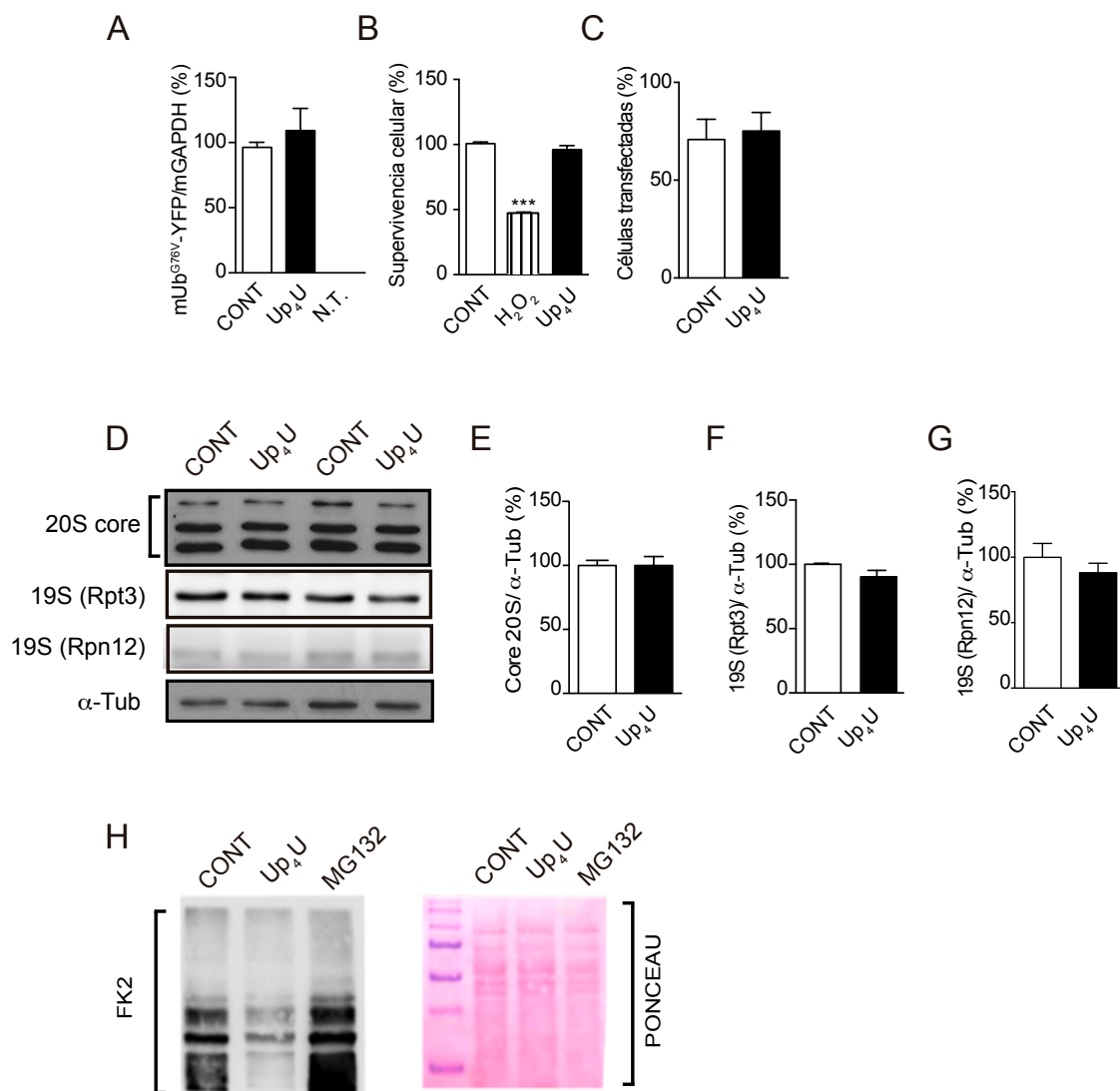
Para confirmar que la disminución observada en los niveles de reportero no era debida a alteraciones en la traducción de las proteínas reporteras, las células N2a fueron transfectadas con el plásmido Ub-M-GFP (Dantuma et al 2000), descrito en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos. Esta molécula reportera, al no presentar la mutación G76V, es rápidamente procesada por el UPS, por lo que sólo se detecta la proteína GFP. En la **Figura 25B** se observa como las células transfectadas con el plásmido Ub-M-GFP y estimuladas con el agonista Up<sub>4</sub>U 100  $\mu$ M durante 24 horas no mostraron diferencias significativas en niveles de GFP ( $113 \pm 3,68\%$ ), respecto a las células estimuladas con la solución vehículo.

En un siguiente paso, quisimos comprobar si la reducción en los niveles de reportero inducidos por Up<sub>4</sub>U se debía a modificaciones a nivel transcripcional. Para este fin se

midieron, mediante RT-qPCR, los niveles de ARNm de Ub<sup>G76V</sup>-YFP procedentes de células N2a-Ub<sup>G76V</sup>-YFP tratadas o no con Up<sub>4</sub>U 100  $\mu$ M durante 24 horas. Como se muestra en la **Figura 26A**, no se detectaron cambios significativos en los niveles de ARNm de la proteína Ub<sup>G76V</sup>-YFP entre los diferentes tratamientos (Control 96,35  $\pm$  3,85%; Up<sub>4</sub>U 109,2  $\pm$  17,01%). Así mismo, mediante estudios de viabilidad celular empleando la técnica del MTT, se confirmó que la disminución de los niveles de reportero observada tampoco era debida a una posible citotoxicidad inducida por el compuesto Up<sub>4</sub>U (Control 100,7  $\pm$  1,28%; Up<sub>4</sub>U 96,12  $\pm$  3,11%) (**Figura 26B**). Por último, tampoco se observó que el dinucleótido produjera modificaciones en el porcentaje de células transfectadas (Control 70,79  $\pm$  10,34%; Up<sub>4</sub>U 75,09  $\pm$  9,51%) (**Figura 26C**).

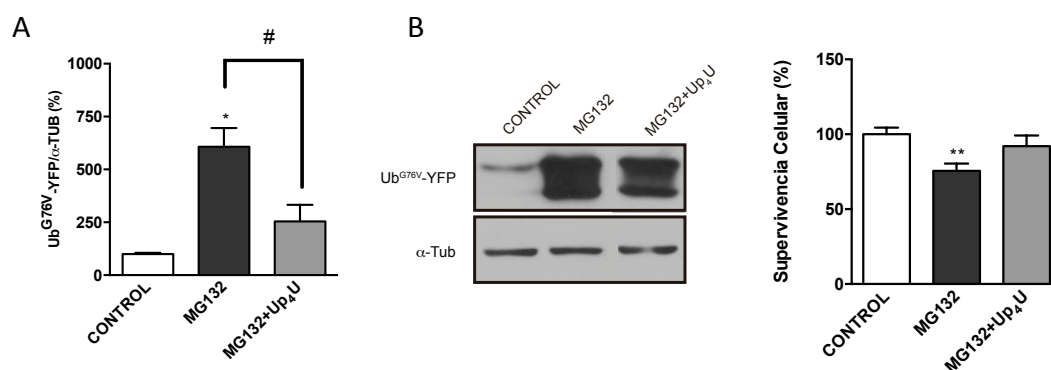
A continuación, se evaluó si la reducción en los niveles de reportero inducida por Up<sub>4</sub>U era debida a que dicho compuesto provocara un incremento en la biogénesis de proteasomas. Para este fin, se analizó si las células N2a estimuladas con Up<sub>4</sub>U mostraban variaciones en el número de núcleos catalíticos 20S. Como se muestra en la **Figura 26D**, no se observaron diferencias significativas en los niveles de núcleos catalíticos entre ambos tratamientos (Control 100  $\pm$  3,36%; Up<sub>4</sub>U 99,91  $\pm$  7,08%). Así mismo, también se analizó si el dinucleótido Up<sub>4</sub>U pudiera estar produciendo variaciones en la expresión de algunas subunidades que conforman el complejo regulador 19S. Los estudios realizados al respecto no mostraron que la estimulación de las células con dicho compuesto provocase variaciones significativas en la expresión de la subunidad Rpt3 (**Figura 26E**) con actividad ATPasa (Control 100  $\pm$  5,77%; Up<sub>4</sub>U 90,32  $\pm$  4,99%) ni en la subunidad Rpn12 (**Figura 276**) con actividad no-ATPasa (Control 100,0  $\pm$  10,62%; Up<sub>4</sub>U 88,21  $\pm$  7,23%).

Puesto que una reducción en la actividad del proteasoma se encuentra asociada a un acúmulo de la cantidad de proteínas poli-Ubiquitinadas (Poli-Ub) (Liu *et al* 2014), decidimos comprobar si, en nuestro modelo experimental, se producían variaciones en dichos niveles. Como se observa en la **Figura 26H**, las células N2a estimuladas con el agonista Up<sub>4</sub>U mostraron una disminución de la cantidad de proteínas poli-Ub. Por el contrario y de forma esperada, el tratamiento de las células con el inhibidor del proteasoma MG132 indujo un acúmulo de la cantidad de proteínas poli-Ub.



**Figura 26.** Diferentes técnicas farmacológicas y de Biología Molecular empleadas para la monitorización del UPS. A) El gráfico representa los niveles relativos de ARNm de Ub<sup>G76V</sup>-YFP medidos mediante PCR cuantitativa y normalizados respecto al control interno GAPDH. B) Ensayos de viabilidad celular medidos mediante MTT. Representación de los porcentajes respecto a las células control no tratadas. C) Eficiencia de la transfección en función de los tratamientos aplicados. En el conteo se cuantificaron un mínimo de 7 campos por condición. D) Autoradiograma representativo de los niveles de proteasomas 20S y de las subunidades Rpt3 y Rpn12 de la subunidad reguladora 19S. E) Variaciones en la expresión del número de núcleos catalíticos 20S. F) Variaciones en la expresión de la subunidad Rpt3 con actividad ATPasa. G) Variaciones en la expresión de la subunidad Rpn12 con actividad no-ATPasa. Como control de carga se utilizó la proteína α-Tub. Los datos se representan como el porcentaje variación de la proteína analizada respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de expresión antes de la estimulación de las células con los diferentes tratamientos. H) Niveles de proteínas poli-Ubiquitinadas (anticuerpo FK2). Como control de carga se utilizó la tinción del colorante Ponceau, que muestra la distribución de las proteínas de una manera inespecífica. Todos los resultados corresponden a la media ± s.e.m de 4 experimentos independientes.

Dado que la estimulación de las células N2a-Ub<sup>G76V</sup>-YFP con Up<sub>4</sub>U favorece la actividad del UPS, quisimos comprobar si este compuesto era capaz de revertir el acúmulo de reportero inducido por un inhibidor del proteasoma. Con este fin, las células N2a-Ub<sup>G76V</sup>-YFP fueron pretratadas durante 20 minutos con el inhibidor del proteasoma MG132 10  $\mu$ M y posteriormente fueron tratadas con el agonista Up<sub>4</sub>U 100  $\mu$ M durante 24 horas. En la **Figura 27A** se muestra que el acúmulo de reportero inducido por el inhibidor MG132 ( $607,2 \pm 88,47\%$ ) se redujo en presencia del agonista Up<sub>4</sub>U ( $254,4 \pm 78,31\%$ ). Además, también se comprobó que la citotoxicidad inducida por MG132 20  $\mu$ M (Das & Bhattacharyya 2014) ( $24,43 \pm 4,91\%$ ) fue revertida cuando las células eran coestimuladas con el agonista Up<sub>4</sub>U (**Figura 27B**).



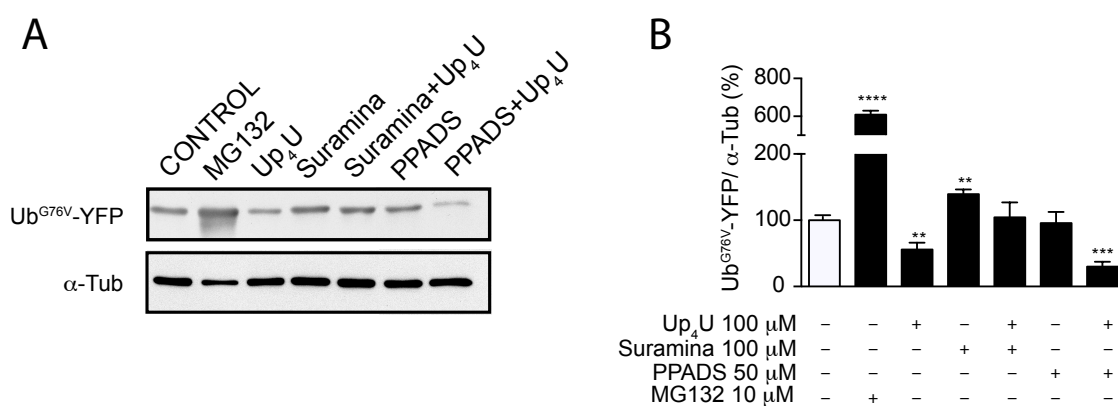
**Figura 27. El agonista Up<sub>4</sub>U puede revertir la inhibición farmacológica del UPS.** A) Efecto del compuesto Up<sub>4</sub>U sobre el acúmulo de reportero Ub<sup>G76V</sup>-YFP inducido por el inhibidor del proteasoma MG132. Como control de carga se utilizó la proteína α-Tub. Los datos se representan como el porcentaje de variación de reportero respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de expresión del reportero antes del tratamiento con el inhibidor o el agonista. B) Efecto del agonista Up<sub>4</sub>U sobre la citotoxicidad inducida por el inhibidor del proteasoma MG132 20  $\mu$ M. En la gráfica se representan los porcentajes en términos de viabilidad celular respecto a las células control no tratadas, medidos mediante MTT. Los resultados representan la media  $\pm$  s.e.m de al menos 4 ensayos independientes. # $p < 0,08$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

### 3. El efecto modulador que ejerce el Up<sub>4</sub>U sobre la actividad del UPS es debido a la activación del receptor P2Y<sub>2</sub>

Para confirmar que el receptor P2Y<sub>2</sub> se encontraba involucrado en los efectos inducidos por el Up<sub>4</sub>U, se realizó una nueva aproximación farmacológica utilizando diferentes antagonistas de los receptores P2Y. En estos ensayos, las células N2a-Ub<sup>G76V</sup>-YFP fueron tratadas con los antagonistas PPADS (50  $\mu$ M, antagonista del receptor P2Y<sub>4</sub>)



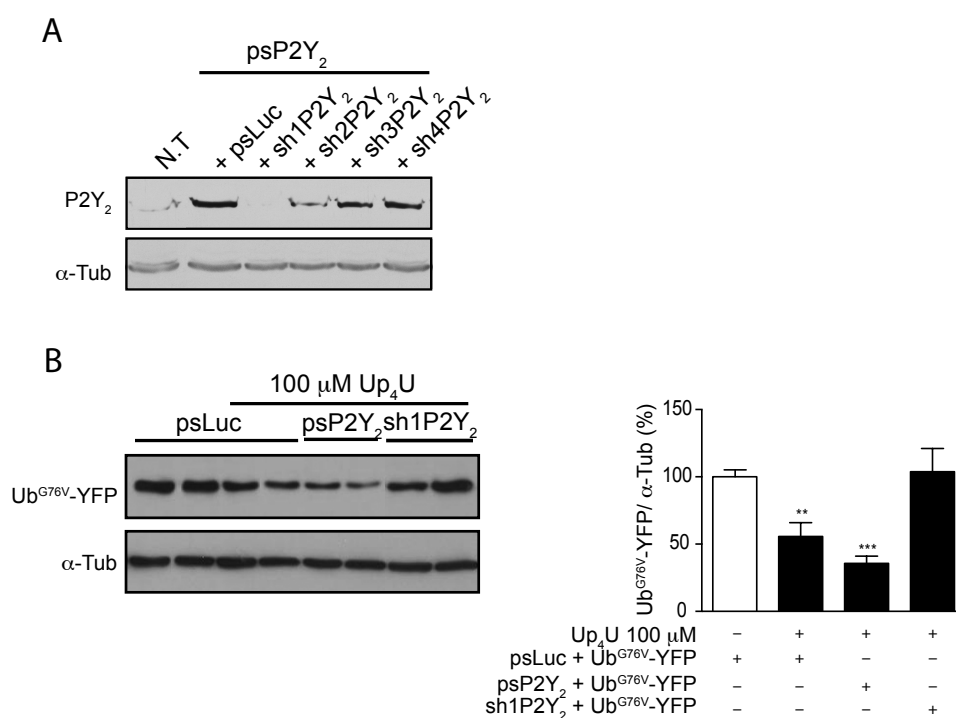
y Suramina (100  $\mu$ M, antagonista no selectivo de los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>). En la **Figura 28** se observa que la Suramina tuvo un efecto contrario al Up<sub>4</sub>U, de tal manera que incrementó un 40% los niveles de reportero. Sin embargo, el tratamiento conjunto de Suramina y Up<sub>4</sub>U no modificó significativamente los niveles basales de reportero (104,3 $\pm$ 22,67%), indicando la participación de un receptor metabotrópico tipo P2Y<sub>2</sub> o P2Y<sub>4</sub>. Por otro lado el antagonista PPADS, que por sí solo no modificó significativamente los niveles de reportero (95,52 $\pm$ 16,96%), no fue capaz de revertir la disminución de proteína inducida por Up<sub>4</sub>U (29,86 $\pm$ 7,57%). Estos resultados descartaban la participación de un receptor P2Y<sub>4</sub> en los efectos inducidos por el Up<sub>4</sub>U sobre el UPS.



**Figura 28. Variaciones de los niveles de expresión de la proteína reportera Ub<sup>G76V</sup>-YFP inducidos por agonistas y antagonistas de los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>.** A) Autoradiograma representativo tras la estimulación de las células con los diferentes tratamientos. B) El gráfico muestra la cuantificación del efecto producido de los diferentes tratamientos sobre la actividad del UPS. Como control de carga se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tub. En la gráfica se representa el porcentaje de variación del reportero respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de expresión del reportero en células tratadas con la solución vehículo. Todos los resultados corresponden a la media $\pm$  s.e.m de 4 experimentos independientes. \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,001.

Los resultados obtenidos en los estudios farmacológicos apuntan a que el efecto producido por el dinucleótido Up<sub>4</sub>U sobre el UPS es mediado por la activación del receptor metabotrópico P2Y<sub>2</sub>. Debido a la falta de antagonistas más específicos que confirmaran la implicación de dicho receptor, se recurrió a la utilización de técnicas de Biología Molecular. Inicialmente se emplearon cuatro ARN interferentes (shARN) comerciales específicos para P2Y<sub>2</sub> (sh1P2Y<sub>2</sub>, sh2P2Y<sub>2</sub>, sh3P2Y<sub>2</sub>, sh4P2Y<sub>2</sub>) los cuales

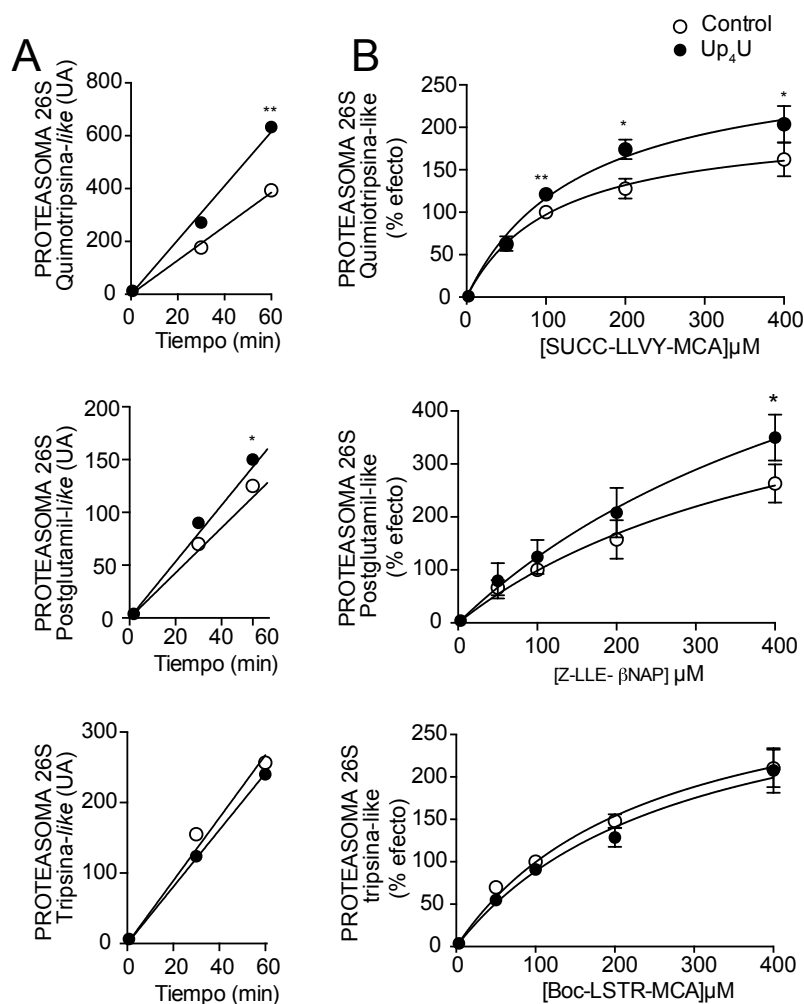
fueron cotransfectados en las células N2a junto con el plásmido para la sobreexpresión del receptor P2Y<sub>2</sub> (psP2Y<sub>2</sub>). Como control de transfección se empleó el plásmido psLuc. En la **Figura 29A**, observamos cómo el silente sh1P2Y<sub>2</sub> abole por completo la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> mientras que el resto de silentes utilizados presentan un efecto más moderado. En un siguiente paso, las células N2a-Ub<sup>G76V</sup>-YFP fueron transfectadas con el plásmido psP2Y<sub>2</sub> o sh1P2Y<sub>2</sub> y a su vez estimuladas con el agonista Up<sub>4</sub>U 100μM durante 24 horas. En la **Figura 29B** podemos observar como la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> produce una disminución significativa de los niveles de reportero (62,92 ± 8,62%). Esta reducción es potenciada cuando dicho receptor es sobreexpresado (35,73 ± 5,28%). Sin embargo, cuando el receptor P2Y<sub>2</sub> fue silenciado, no se observaron modificaciones sobre los niveles de reportero (103,8 ± 17,29%). Estos resultados confirman que el receptor P2Y<sub>2</sub> se encuentra implicado en la modulación de la actividad del UPS inducida por el dinucleótido Up<sub>4</sub>U.



**Figura 29. Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento del receptor P2Y<sub>2</sub> sobre la actividad del UPS** A) Estudio de la selectividad de diferentes silentes frente al receptor P2Y<sub>2</sub>. B) Eficiencia de los plásmidos para la sobreexpresión y silenciamiento del receptor P2Y<sub>2</sub>. Como control de carga se utilizó la proteína α-Tub. Los datos se representan como el porcentaje de variación de los niveles de reportero respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de expresión del reportero en células cotransfectadas con el plásmido control psLuc y tratadas con la solución vehículo. Todos los resultados corresponden a la media ± sem de 3 experimentos independientes. \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0,001.

#### 4. La activación *in vitro* del receptor P2Y<sub>2</sub> modula las actividades catalíticas del proteasoma y la expresión de las subunidades $\beta$ constitutivas

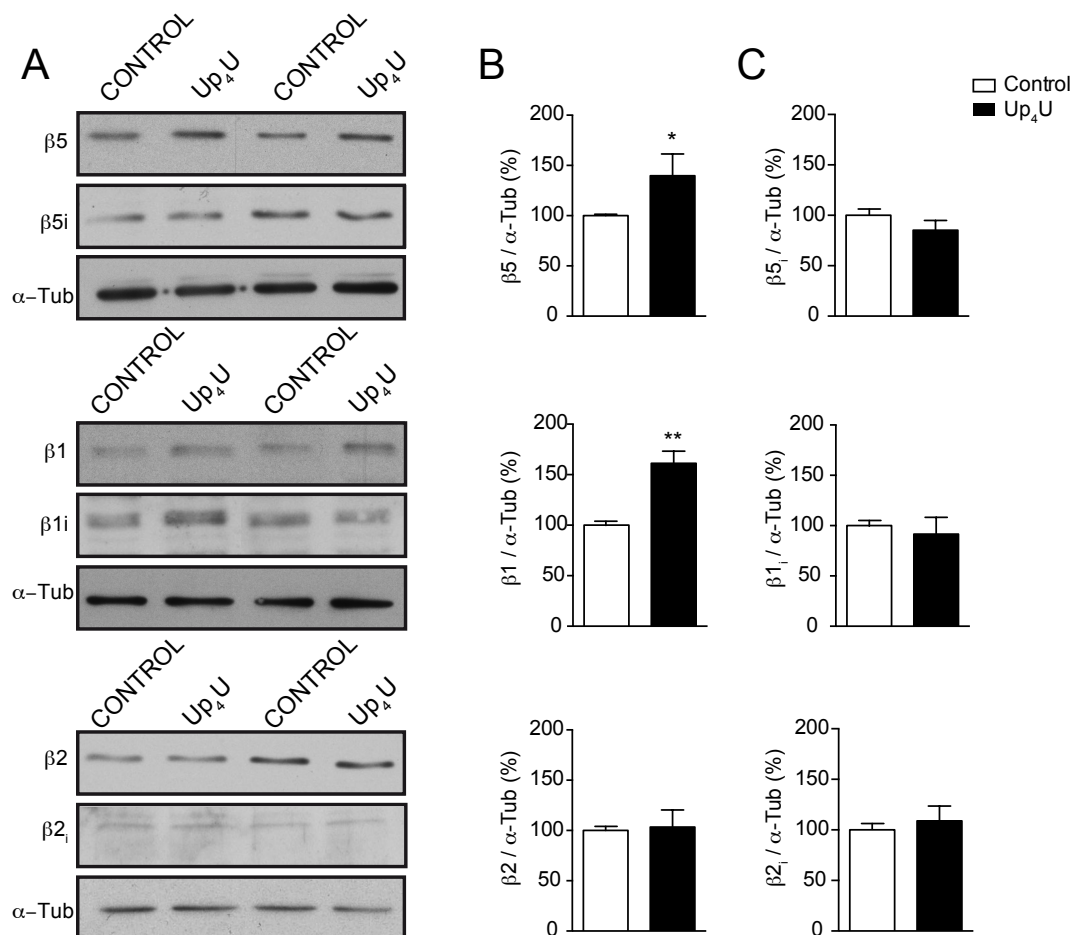
Para estudiar los mecanismos moleculares por los cuales el receptor P2Y<sub>2</sub> es capaz de modular la actividad del UPS decidimos analizar las actividades catalíticas del proteasoma. Para ello se evaluó si la estimulación de las células N2a tratadas con Up<sub>4</sub>U 100  $\mu$ M durante 24 horas inducía alguna variación en las actividades proteolíticas del proteasoma.



**Figura 30. La activación del receptor P2Y<sub>2</sub> regula las actividades catalíticas del proteasoma** A) Estudio tiempo-dependiente de las actividades CT-L, PG-L y T-L del proteasoma 26S. Los datos están representados en unidades arbitrarias (UA) y corresponden a la media  $\pm$  s.e.m. de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. B) Representación de Michaelis-Menten de las actividades CT-L, PG-L y T-L del proteasoma 26S. Los datos están representados como el porcentaje de aumento de actividad y representan la media  $\pm$  s.e.m. de 5 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ .

Como se muestra en la **Figura 30A**, la estimulación de las células con Up<sub>4</sub>U indujo un aumento significativo tanto de la actividad Quimotripsina-like (CT-L) y Postglutamil-like (PG-L), pero no así de la actividad Tripsina-like (T-L). Además, los estudios cinéticos realizados (**Figura 30B**) mostraron que la estimulación con Up<sub>4</sub>U provocaba un aumento significativo de la V<sub>max</sub> en las actividades CT-L y PG-L (CT-L Control: 205,5 ± 23,16%; Up<sub>4</sub>U: 284,6 ± 30,48 %; PG-L Control: 568,2 ± 133,8 %; Up<sub>4</sub>U: 862,5 ± 256 %). Sin embargo, los valores de K<sub>m</sub> no sufrieron modificaciones significativas para dichas actividades (CT-L Control: 111,4 ± 33,36 μM; Up<sub>4</sub>U: 144,3 ± 37,16 μM; PG-L Control: 476,3 ± 178 μM; Up<sub>4</sub>U: 594 ± 262,8 μM), lo que parecía indicar que la estimulación con Up<sub>4</sub>U no modificaba la afinidad por el sustrato. Cuando se analizó la actividad T-L no se observaron diferencias significativas ni en el valor de la V<sub>max</sub> ni en el valor de la K<sub>m</sub>.

Dado que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub>, a través de su agonista Up<sub>4</sub>U, no produjo modificaciones en el número de proteasomas sintetizados, se decidió comprobar si el aumento de las actividades CT-L y PG-L era debido a un incremento de la expresión de las subunidades β constitutivas o si bien éstas estaban siendo reemplazadas por otras con una actividad catalítica mayor, como son las subunidades inducibles del inmunoprotosoma (βi). Para este fin, se cuantificó la expresión de las diferentes subunidades β y βi mediante técnicas de inmunotransferencia. En la **Figura 31** podemos observar cómo la estimulación de las células con Up<sub>4</sub>U 100 μM durante 24 horas produjo un aumento significativo de la expresión de las subunidades β5 (139,6 ± 21,60%) y β1 (161,3 ± 12,1%), mientras que sus correspondientes subunidades inducibles no sufrieron modificaciones significativas en sus niveles de expresión (β5i: 85,22 ± 9,682; β1i: 91,59 ± 16,70%). En cuanto a la subunidad β2 y β2i no se encontraron diferencias significativas en sus niveles de expresión tras la estimulación de las células con Up<sub>4</sub>U (β2: 103,3 ± 17,08%; β2i: 109,0 ± 14,66%).

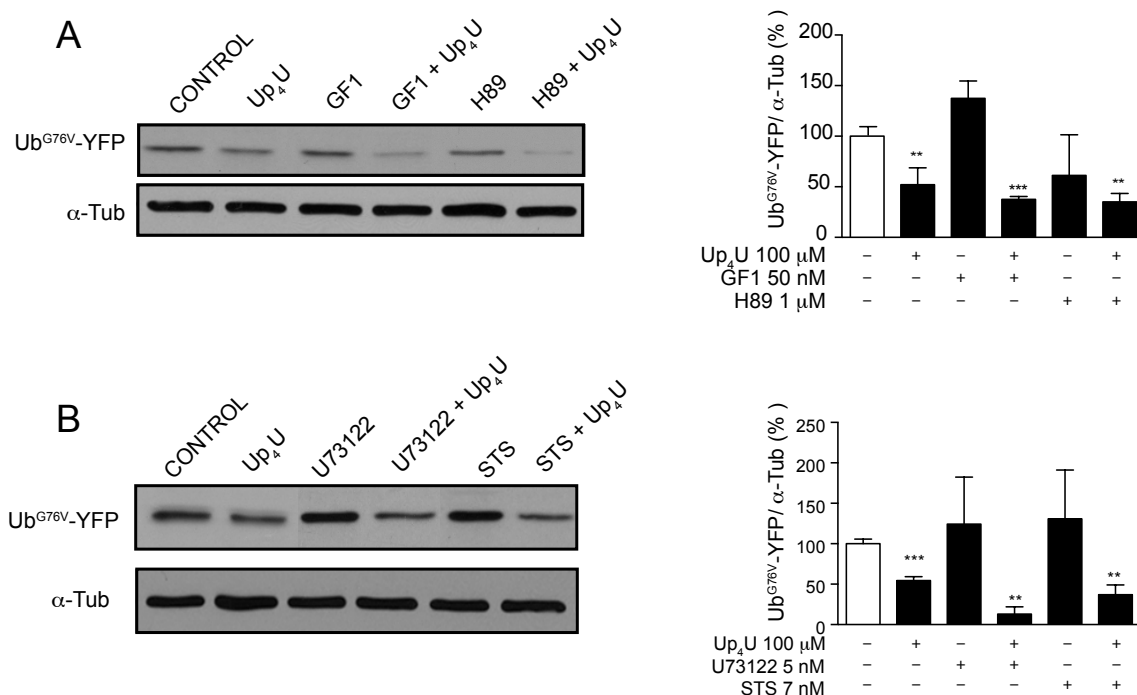


**Figura 31. Análisis de la expresión de las subunidades constitutivas e inducibles del proteasoma 26S.** A) Autoradiograma representativo de las subunidades  $\beta$  constitutivas e inducibles. B) Expresión de las subunidades  $\beta$  constitutivas C) Expresión de las subunidades  $\beta$  inducibles. Como control de carga se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tub. Los datos se representan como el porcentaje de variación de las diferentes subunidades proteolíticas del proteasoma respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de expresión de estas subunidades en células tratadas con la solución vehículo. Todos los resultados corresponden a la media  $\pm$  s.e.m de al menos 6 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ .

## 5. Las quinasas MEK1/2 y PI3K se encuentran implicadas en el efecto modulador que el receptor P2Y<sub>2</sub> ejerce sobre el UPS

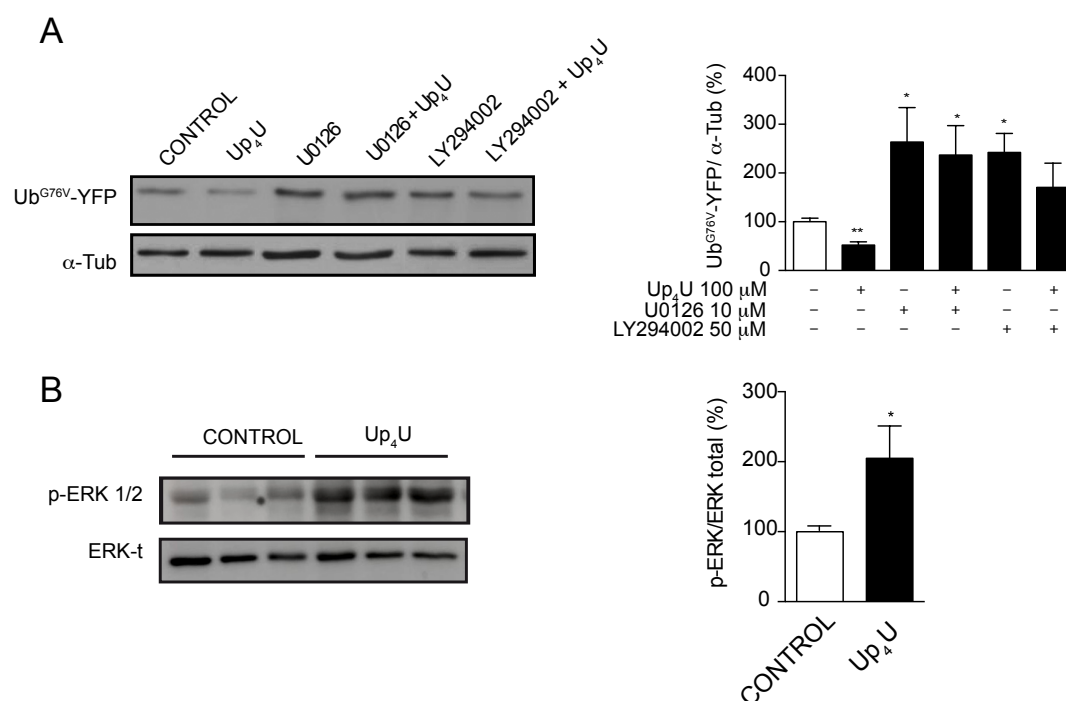
Una vez comprobado que el receptor P2Y<sub>2</sub> es capaz de modificar la actividad proteolítica del UPS, nos propusimos identificar la ruta de señalización intracelular implicada en este fenómeno. Para ello, utilizamos una amplia batería de inhibidores selectivos de las principales quinasas intracelulares asociadas a este receptor. Puesto que

se ha descrito que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> está asociada a la activación de la proteína quinasa A (PKA) o proteína quinasa C (PKC) (Ballerini et al 2006), decidimos investigar si estas quinasas se encontraban involucradas en dicha ruta de señalización. Sin embargo, cuando las células N2a-Ub<sup>G76V</sup>-YFP fueron tratadas con los inhibidores selectivos de PKC (GF1 50 nM o STS 7nM) o el inhibidor selectivo de PKA (H89 1μM) no se observó ninguna modificación en los niveles basales de reportero (**Figura 32**). Además, el pretratamiento de las células con estos inhibidores no previno la disminución de reportero inducida por Up<sub>4</sub>U. Resultados similares se obtuvieron cuando las células N2a-Ub<sup>G76V</sup>-YFP fueron pretratadas con el inhibidor específico de la Fosfolipasa C (PLC, U73122 5nM).



**Figura 32. Implicación de las quinasas PKC, PKA y PLC en la respuesta inducida por el dinucleótido Up<sub>4</sub>U sobre los niveles de reportero.** A) Efecto producido por los inhibidores GF1 (50 nM) y H89 (1 μM) sobre los niveles de reportero Ub<sup>G76V</sup>-YFP. B) Efecto producido por los inhibidores U73122 (5 nM) y STS (7nM) sobre los niveles de reportero Ub<sup>G76V</sup>-YFP. Como control de carga se utilizó la proteína α-Tub. Los datos se representan como el porcentaje de variación de los niveles del reportero respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de reportero tratado con la solución vehículo. Los resultados corresponden a la media ± sem de 3 experimentos independientes \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001.

Sin embargo, cuando las células fueron pretratadas con los inhibidores selectivos de PI3K (LY294002 50  $\mu$ M) o de las MAPK (U0126 50  $\mu$ M) se produjo un aumento de los niveles basales de reportero. Este incremento se mantuvo incluso cuando las células fueron tratadas conjuntamente con el agonista Up<sub>4</sub>U (**Figura 33A**). Estos resultados parecían indicar que tanto PI3K como MAPK se encontraban implicadas en la ruta de señalización intracelular activada por el receptor P2Y<sub>2</sub>. Ya que se encuentra descrito que ERK1/2 son quinasas sustrato de MAPK, se procedió a medir posibles variaciones en la fosforilación de ERK1/2. En la **Figura 33B** observamos como los niveles de fosforilación de ERK1/2 aumentaron significativamente tras la activación del receptor P2Y<sub>2</sub>, indicando que esta quinasa se encuentra implicada en la ruta de señalización intracelular inducida por la activación del receptor P2Y<sub>2</sub>.



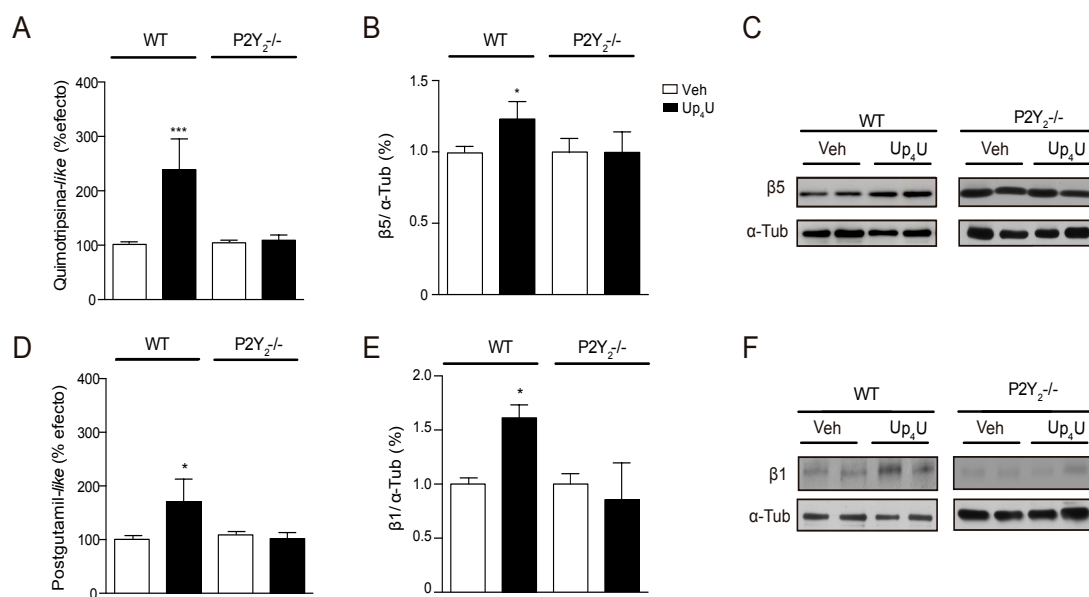
**Figura 33. Las quinasas MAPK y PI3K están implicadas en ruta de transducción del receptor P2Y<sub>2</sub>.** A) Efecto producido por los inhibidores U0126 (50  $\mu$ M) y LY294002 (50  $\mu$ M) sobre los niveles de reportero Ub<sup>G76V</sup>-YFP junto a sus correspondientes autoradiogramas representativos. B) Modificaciones en los niveles de fosforilación de ERK1/2 tras la estimulación con Up<sub>4</sub>U 100  $\mu$ M. Como control de carga se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tub. Los datos se representan como el porcentaje de variación de los niveles del reportero respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de reportero de las células tratadas con la solución vehículo. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  s.e.m de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

## 6. La activación *in vivo* del receptor P2Y<sub>2</sub> produce un aumento de la actividad catalítica del UPS y de la expresión de las subunidades $\beta$ constitutivas

Dado que los estudios *in vitro* sugieren que el receptor P2Y<sub>2</sub> modula la actividad del UPS, se procedió a comprobar si la activación *in vivo* del receptor P2Y<sub>2</sub> también es capaz de modular dicha actividad. Con este fin, se procedió a medir la actividad del proteasoma en extractos de hipocampo de ratones silvestres y ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> previamente tratados con el dinucleótido Up<sub>4</sub>U. En este estudio no se analizó la actividad tripsina al no haberse observado modificaciones *in vitro* ni en la actividad proteolítica ni en los niveles de expresión de sus correspondientes subunidades. En estos experimentos, a los ratones silvestres y ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> se les administró intracerebroventricularmente (i.c.v) la solución vehículo (Veh, PBS) y/o Up<sub>4</sub>U (2  $\mu$ L de Up<sub>4</sub>U 45mM). Tras 24 horas de la administración, los animales fueron sacrificados y se procedió a la disección y extracción del hipocampo tratado para medir las actividades CT-L y PG-L del proteasoma.

En la **Figura 34A** y **34D** podemos observar que la administración *in vivo* de Up<sub>4</sub>U a ratones silvestres produjo un aumento significativo de la actividad CT-L ( $238,8 \pm 56,73\%$ ) y PG-L ( $170,6 \pm 42,37\%$ ), mientras que en los ratones carentes del receptor P2Y<sub>2</sub> esta administración no indujo diferencias significativas en la actividad CT-L ( $109,0 \pm 9,647\%$ ) y PG-L ( $101,8 \pm 11,5\%$ ). Posteriormente, en estos mismos extractos, se midieron los niveles de expresión de las subunidades  $\beta$  y  $\beta$ i. En la **Figura 34B** y **34E** se muestra que la administración *in vivo* de Up<sub>4</sub>U a ratones silvestres produjo un incremento en la expresión de la subunidad  $\beta$ 1 ( $161,3 \pm 12,01\%$ ) y  $\beta$ 5 ( $123,1 \pm 12,23\%$ ), aumento que no fue observado en los ratones deficientes del receptor P2Y<sub>2</sub> tratados con dicho compuesto ( $\beta$ 5:  $99,72 \pm 14,33\%$ ;  $\beta$ 1:  $85,65 \pm 54,04\%$ ).





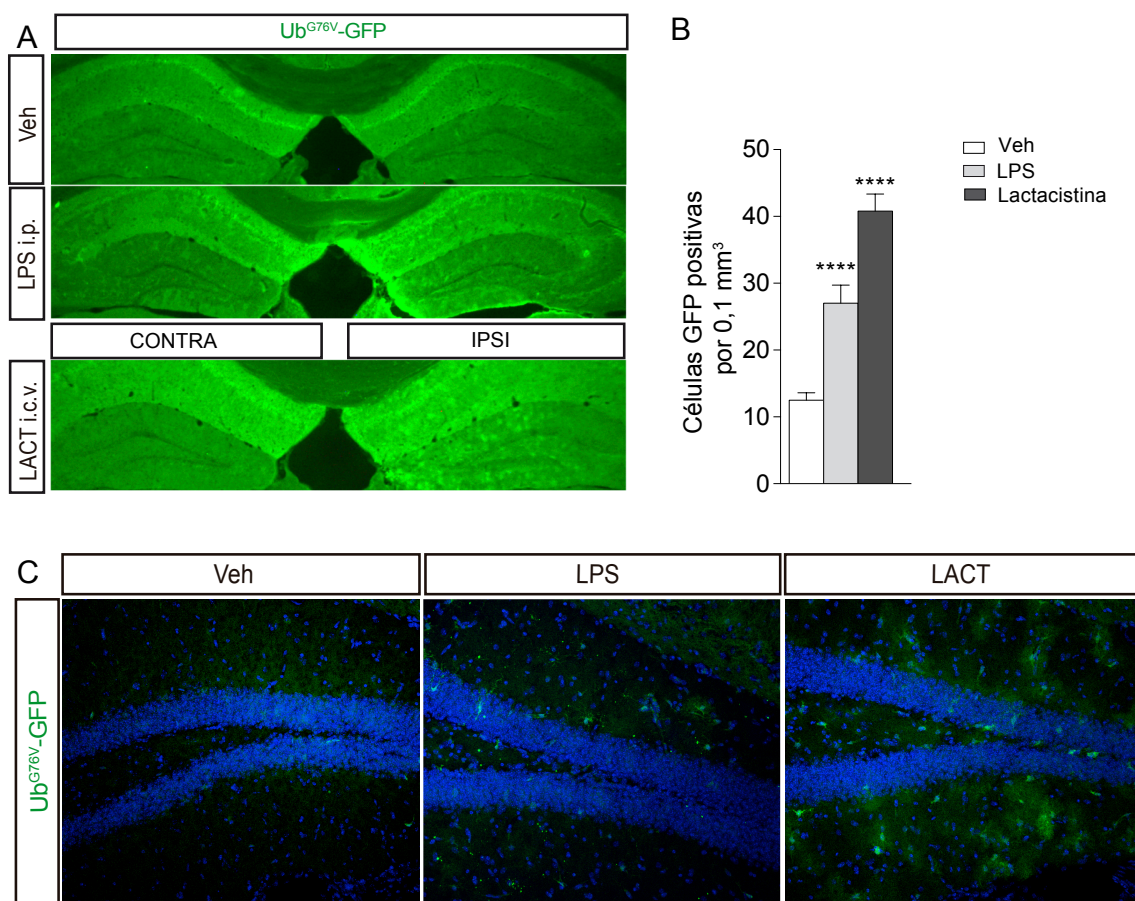
**Figura 34. Efecto de la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> sobre la actividad del proteasoma 26S y la expresión de las subunidades β en extractos de hipocampo de ratones silvestres y P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>.** A) Medida de la actividad catalítica CT-L. B) Cuantificación de la expresión de la subunidad β5 mediante Inmunotransferencia. C) Autoradiograma representativo de la expresión de la subunidad β5. D) Medida de la actividad catalítica PG-L. E) Cuantificación de la expresión de la subunidad β1 mediante inmunotransferencia. F) Autoradiograma representativo de la expresión de la subunidad β1. Como control de carga se utilizó la proteína α-Tub. Los datos están representados como el porcentaje de aumento de actividad o de expresión respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de actividad o de expresión cuando los ratones fueron tratados con la solución vehículo. Todos los resultados representan la media ± s.e.m de 4 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Las siglas WT hacen referencia a los ratones silvestres. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.

## 7. La neuroinflamación inducida por LPS altera el correcto funcionamiento del UPS

Estudios previos han reportado que la inducción de un cuadro neuroinflamatorio puede afectar al correcto funcionamiento de la actividad del UPS (Qureshi et al 2003, Qureshi et al 2005, Reis et al 2011). Con el fin de determinar si el receptor P2Y<sub>2</sub> juega un papel relevante en este fenómeno, los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP adultos fueron inyectados intraperitonealmente (i.p) con el Lipopolisacárido (LPS) a una dosis de 5mg/Kg, siguiendo el protocolo que se describe en la **Figura 19** de Materiales y Métodos. Esta dosis de LPS fue seleccionada porque si bien induce alteraciones en la actividad del UPS, no desencadena una toxicidad *in vivo* (Jangula &

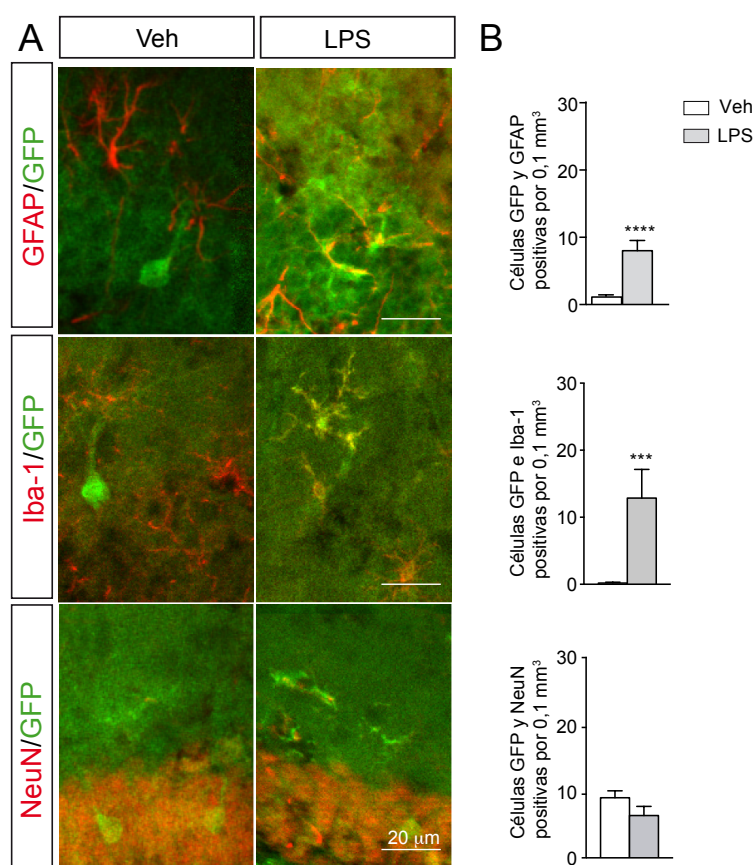
Murphy 2013). Tras 48 horas de la administración de la endotoxina, los ratones fueron sacrificados y, mediante técnicas de inmunofluorescencia (IF), se cuantificó el número de células que presentaban un acúmulo de reportero en el hipocampo, en particular en el giro dentado.

Como se puede observar en la **Figura 35**, la administración i.p de LPS indujo un aumento significativo en ambos hipocampos del número de células que presentaban una actividad del UPS alterada ( $25,39 \pm 2,4$  células por  $0,1 \text{ mm}^3$ ). Paralelamente, y como control, se administró i.c.v 2  $\mu\text{L}$  del inhibidor irreversible del proteasoma, Lactacistina, a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . En este caso, se observó un acúmulo localizado de células verdes en el hipocampo ipsilateral ( $35,08 \pm 3,8$  células verdes por  $0,1 \text{ mm}^3$ ).



**Figura 35.** Acumulación del reportero Ub<sup>G76V</sup>-GFP mediante administración in vivo de LPS y Lactacistina en ratón Ub<sup>G76V</sup>-GFP. A) Detección de Ub<sup>G76V</sup>-GFP (verde) según el método de administración. B) Cuantificación del número de células que acumulan Ub<sup>G76V</sup>-GFP por  $0,1 \text{ mm}^3$  en el hipocampo ipsilateral. C) Imágenes de detección de la fluorescencia de GFP (verde) en secciones coronales del hipocampo ipsilateral. \*\*\*\* $p < 0,0001$

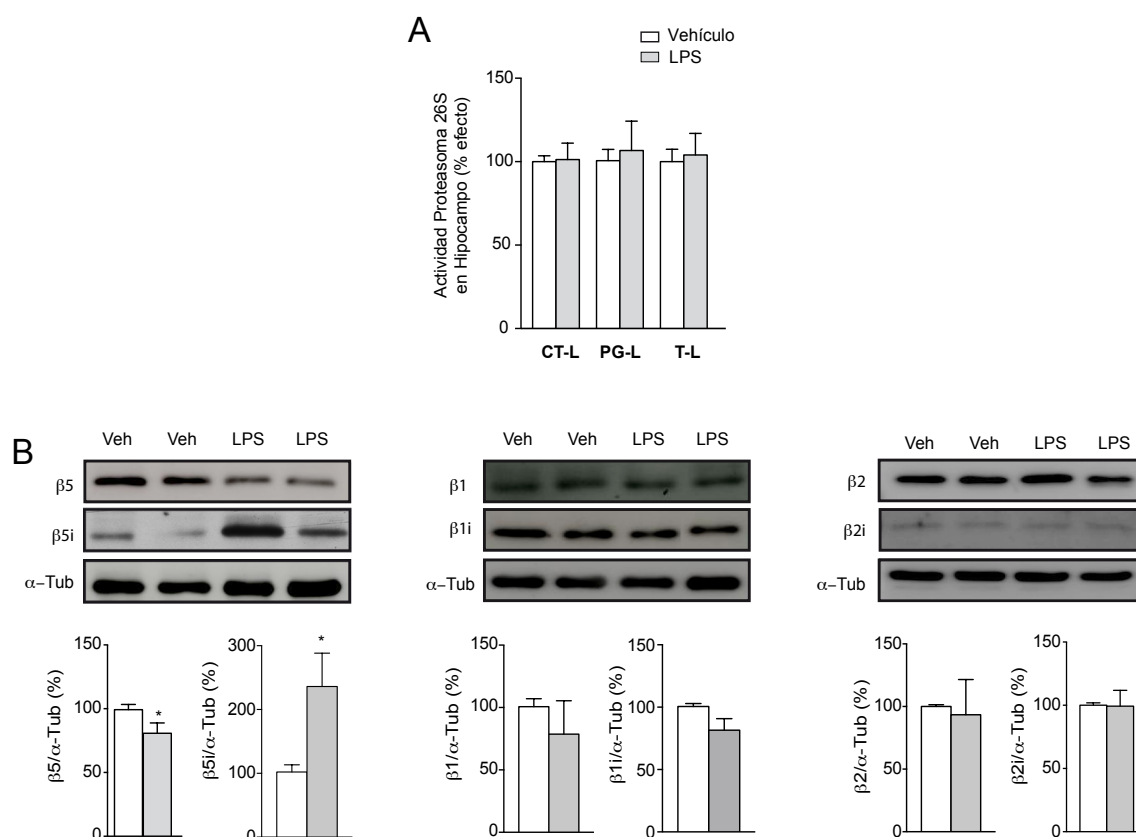
Gracias al empleo de diferentes anticuerpos específicos que permiten identificar los distintos linajes celulares presentes en el hipocampo, pudimos determinar que el acúmulo de reportero Ub<sup>G76V</sup>-GFP se produjo principalmente en las células gliales. En las **Figuras 36A** y **Figura 36B** podemos observar cómo, en el caso de los astrocitos, la administración de LPS multiplicó por 8 el número de células que presentaban un acúmulo significativo del reportero Ub<sup>G76V</sup>-GFP. En cuanto a las células microgliales, se observó que la administración de LPS multiplicó por 10 el número de células que presentaban una actividad del UPS comprometida. Sin embargo, hay que destacar que, la administración de LPS no produjo modificaciones significativas en el número de neuronas que presentaban un acúmulo significativo de reportero.



**Figura 36. Tipos celulares que acumulan Ub<sup>G76V</sup>-GFP tras la administración in vivo de LPS.** A) Imágenes representativas correspondientes a estudios de colocalización de células hipocámpales que acumulan Ub<sup>G76V</sup>-GFP (verde) teñidas mediante IF con marcadores (rojo) de astrocitos (GFAP), microglia (Iba-1) y neuronas (NeuN). B) Gráficos donde se detalla la cuantificación del número de células que acumulan Ub<sup>G76V</sup>-GFP según el tipo celular. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m de al menos 4 experimentos. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$

A continuación, se estudió si el acúmulo de reportero observado era debido a una disminución de las actividades del proteasoma. Para ello, se analizaron las tres actividades enzimáticas del proteasoma en homogenados de hipocampo de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados o no con LPS (**Figura 37A**). Los resultados obtenidos reflejaron

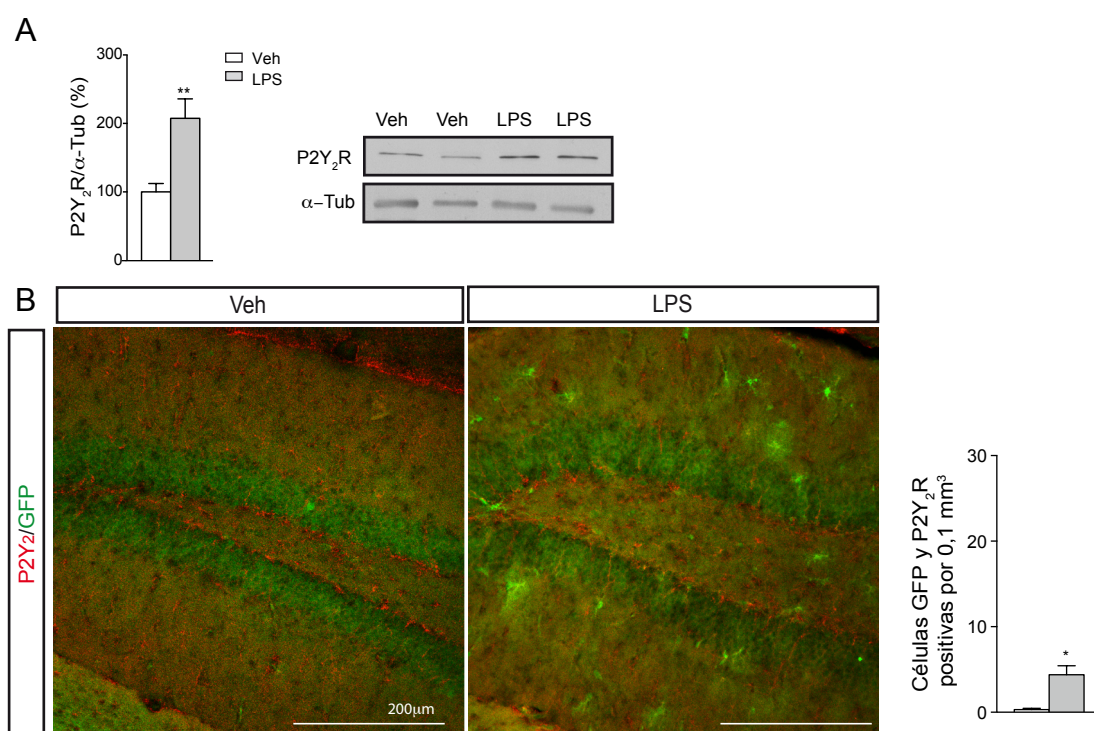
que ninguna de las tres actividades proteolíticas sufrieron modificaciones como consecuencia de la administración de LPS (CT-L:  $101,3 \pm 9,77\%$ ; PG-L:  $106,7 \pm 17,59\%$ ; T-L:  $104,0 \pm 13\%$ ). Sin embargo, cuando se analizó la expresión de las subunidades  $\beta$  constitutivas e inducibles del proteasoma (Figura 37B), se observó que el tratamiento con LPS produjo una disminución significativa en la expresión de la subunidad constitutiva  $\beta 5$  ( $76,57 \pm 10,86\%$ ), mientras que su correspondiente subunidad inducible  $\beta 5i$  experimentaba un aumento muy significativo de su expresión ( $236,2 \pm 52,19\%$ ). No se observaron modificaciones significativas en el resto de subunidades constitutivas e inducibles correspondientes a las actividades PG-L ( $\beta 1$  LPS:  $78,73 \pm 26,72\%$ ;  $\beta 1i$  LPS:  $81,56 \pm 9,26\%$ ) y T-L ( $\beta 2$  LPS:  $93,49 \pm 28,04\%$ ;  $\beta 2i$  LPS:  $99,34 \pm 12,49\%$ ).



**Figura 37. Efecto de la administración in vivo de LPS sobre la actividad del UPS en ratones  $Ub^{G76V}$ -GFP.** A) Medida de las actividades CT-L, PG-L y T-L en homogenados de hipocampo de ratones  $Ub^{G76V}$ -GFP tratados. B) Expresión de las subunidades  $\beta$  constitutivas e inducibles junto a sus correspondientes autorradiogramas representativos. Como control de carga se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tub. Los gráficos muestran el porcentaje de variación de actividad enzimática o de expresión de las subunidades catalíticas del proteasoma de los ratones tratados con LPS respecto a los valores basales, siendo el valor 100% los niveles de actividad o de expresión cuando los ratones fueron tratados con la solución vehículo. Todos los resultados representan la media  $\pm$  s.e.m de 4 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. \* $p < 0,05$

## 8. La administración de LPS produce un aumento de expresión del receptor P2Y<sub>2</sub>

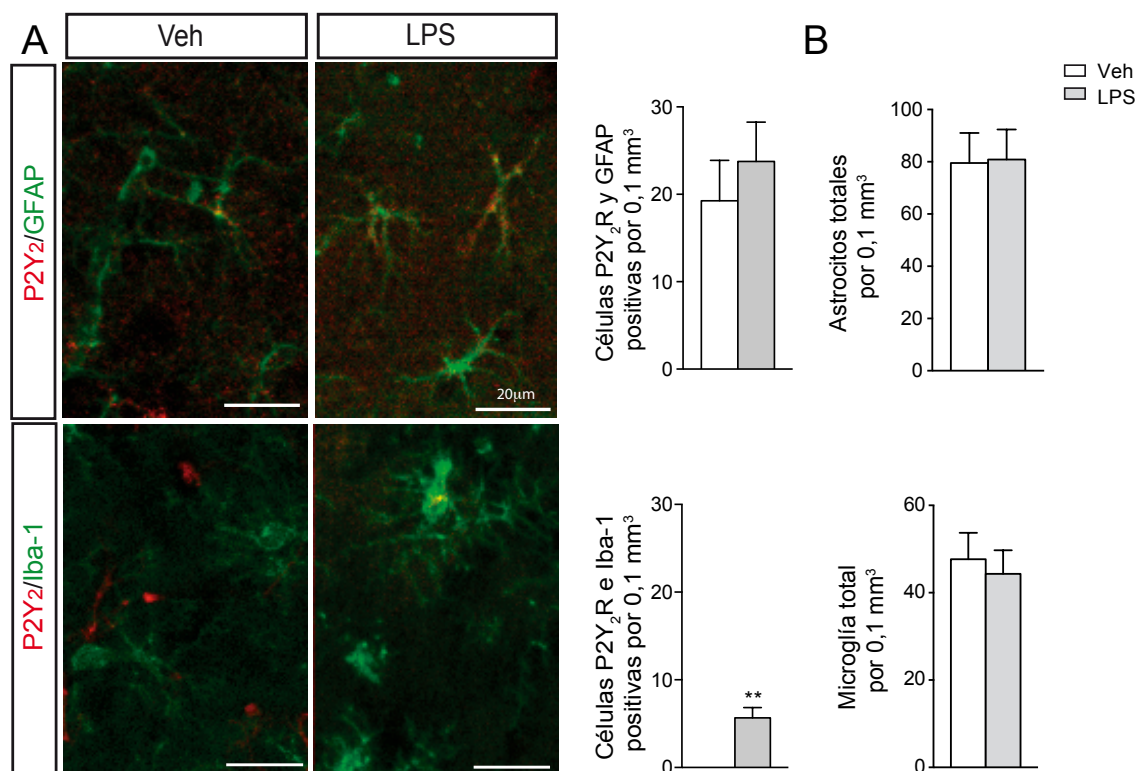
Dado que en trabajos previos se ha descrito que bajo un estímulo proinflamatorio se produce un incremento en los niveles de ARNm del receptor P2Y<sub>2</sub> (Kong *et al* 2009), quisimos comprobar si en nuestro modelo experimental, la administración de LPS modificaba la expresión de dicho receptor. Para ello se midieron, mediante técnicas de inmunotransferencia, los niveles de P2Y<sub>2</sub> en extractos de hipocampo de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados i.p con la solución vehículo o LPS. Los resultados representados en la **Figura 38A** muestran como la administración de LPS produjo un aumento muy significativo de la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en el hipocampo ( $207,6 \pm 28,31\%$ ). Además, un análisis posterior reveló que las células que presentaba un acúmulo de reportero y que además expresaban el receptor P2Y<sub>2</sub> se multiplicaba por 10 tras la administración de LPS (Vehículo:  $0,3 \pm 0,15$  células por  $0.1 \text{ mm}^3$ ; LPS:  $4,63 \pm 0,94$  células por  $0.1 \text{ mm}^3$ ) (**Figura 38B**).



**Figura 38. Variación de expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> inducida por LPS.** A) Niveles de expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en homogenados de hipocampo tras ser tratados con la solución vehículo o LPS 5mg/Kg. Como control de carga se utilizó la proteína α-Tub. Los datos representan el porcentaje de variación de expresión, siendo el 100% los niveles de P2Y<sub>2</sub> hallados en ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados con la solución vehículo B) Imágenes de IF del giro dentado de ratones tratados con LPS o solución vehículo que acumulan Ub<sup>G76V</sup>-GFP (verde) y que expresan el receptor P2Y<sub>2</sub>(rojo) junto a su correspondiente conteaje. \*\*p<0,01

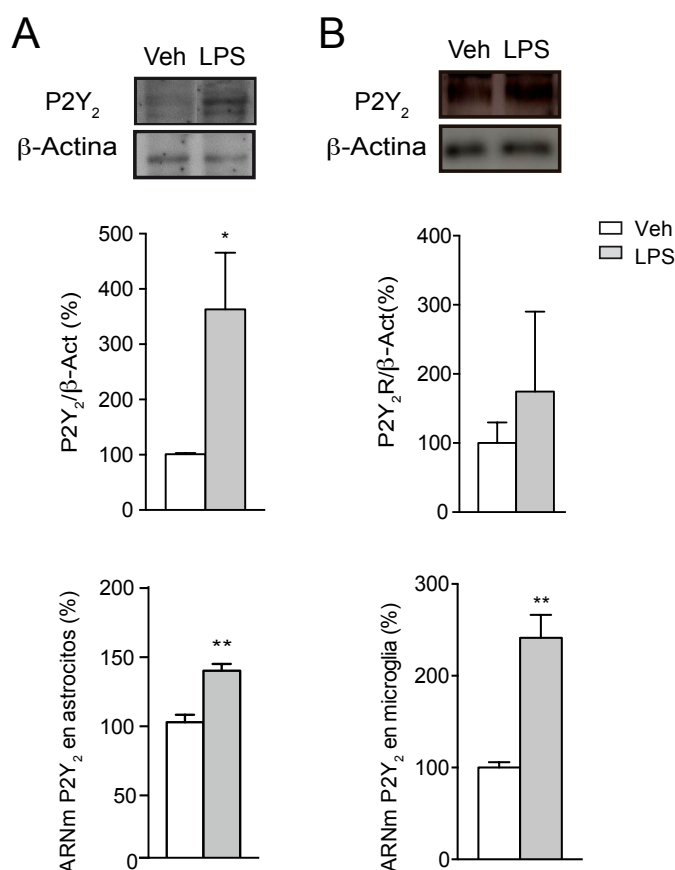


No obstante, un análisis más detallado de secciones hipocampales procedentes de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados con LPS reveló que, mayoritariamente, las células que expresan el receptor P2Y<sub>2</sub> no presentan un acúmulo de reportero. Además, cabe destacar que mientras que la administración de LPS no produjo un aumento en el número de astrocitos que expresaban el receptor P2Y<sub>2</sub> (Veh 19,25 ± 4,63 células por 0.1 mm<sup>3</sup>; LPS 23,75 ± 4,52 células por 0.1 mm<sup>3</sup>), el número de células microgliales que expresan dicho receptor se multiplicó por 5 (Veh 0,0 ± 0,0 células por 0.1 mm<sup>3</sup>; LPS 5,0 ± 0,5 células por 0.1 mm<sup>3</sup>), (**Figura 39A**). Sin embargo, el tratamiento con LPS no produjo un incremento ni en el número total de astrocitos (Veh 79,56 ± 11,48; LPS 80,91 ± 11,43 células por 0.1 mm<sup>3</sup>) ni en el número total de microglías (Veh 47,67 ± 6,042; LPS 44,33 ± 5,377 células por 0.1 mm<sup>3</sup>) (**Figura 39B**).



**Figura 39. Expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en las células gliales del hipocampo de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados con LPS o solución vehículo.** A) Imágenes de IF con anticuerpos anti- P2Y<sub>2</sub> (rojo), anti-GFAP (verde) o anti-Iba (verde) donde también se muestra la cuantificación y colocación del número de astrocitos (GFAP) y microglía (Iba-1) que expresan el receptor P2Y<sub>2</sub> tras la administración de la solución vehículo o LPS 5 mg/Kg B) Cuantificación del número de astrocitos y microglía totales por 0,1 mm<sup>3</sup> tras los tratamientos. Los datos representan la media ± s.e.m de al menos 3 experimentos independientes. \*\*p<0,01

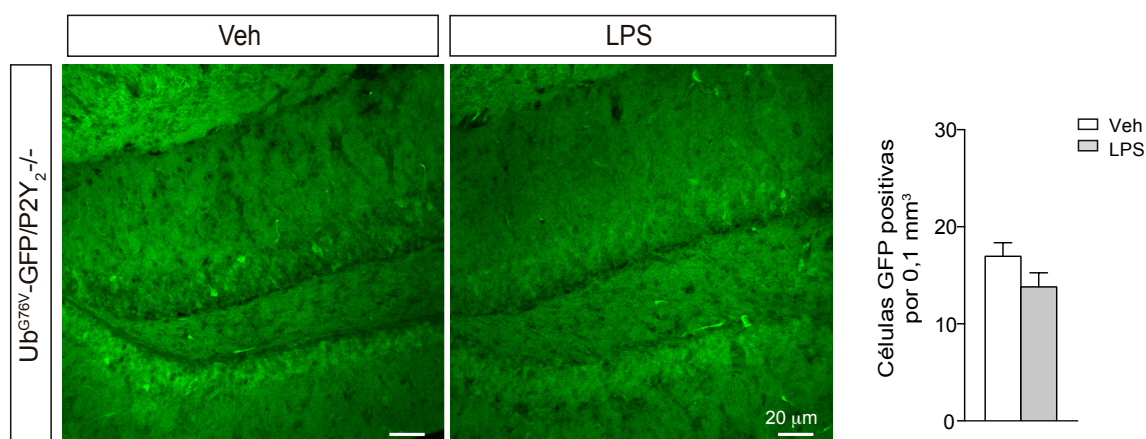
Con el fin de estudiar la influencia que pudiera tener el receptor P2Y<sub>2</sub> en la regulación de la proteostasis glial, se cultivaron células astrogliales y microgliales aislados de ratón. En estos cultivos se midieron las variaciones de expresión o modificaciones en los niveles de ARNm del receptor P2Y<sub>2</sub> cuando estas células fueron sometidas al estímulo proinflamatorio LPS. En la **Figura 40A** y **40B** observamos cómo la estimulación de los astrocitos y microglía con LPS 0,3 µg/µL produjo un aumento significativo tanto de los niveles de mensajero del receptor P2Y<sub>2</sub> (Astrocitos: 138,1 ± 4,97%; Microglía: 241,4 ± 25,06%), como en la expresión de la proteína de dicho receptor (Astrocitos: 363,1 ± 102,8%). Sin embargo, aunque existe cierta tendencia, el aumento de expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> observado en la microglía no fue significativo (Microglía: 174,5 ± 115,6%).



**Figura 40. Expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en cultivos primarios de astrocitos y microglía estimulados con LPS.** A) Variación en los niveles de expresión de la proteína o en los niveles de ARNm del receptor P2Y<sub>2</sub> en células astrogliales en cultivo B) Variación en los niveles de expresión de la proteína o en los niveles de ARNm del receptor P2Y<sub>2</sub> en células microgliales en cultivo. Como control de carga se utilizó la proteína β-actina. Los datos están representados como el porcentaje de variación de expresión de P2Y<sub>2</sub>, siendo el valor 100% los niveles de expresión detectados en células tratadas con la solución vehículo. Los resultados representan la media ± s.e.m de al menos 3 cultivos independientes. \*p<0,05, \*\*p<0,01

## 9. El receptor P2Y<sub>2</sub> juega un papel relevante en la respuesta inflamatoria inducida por LPS

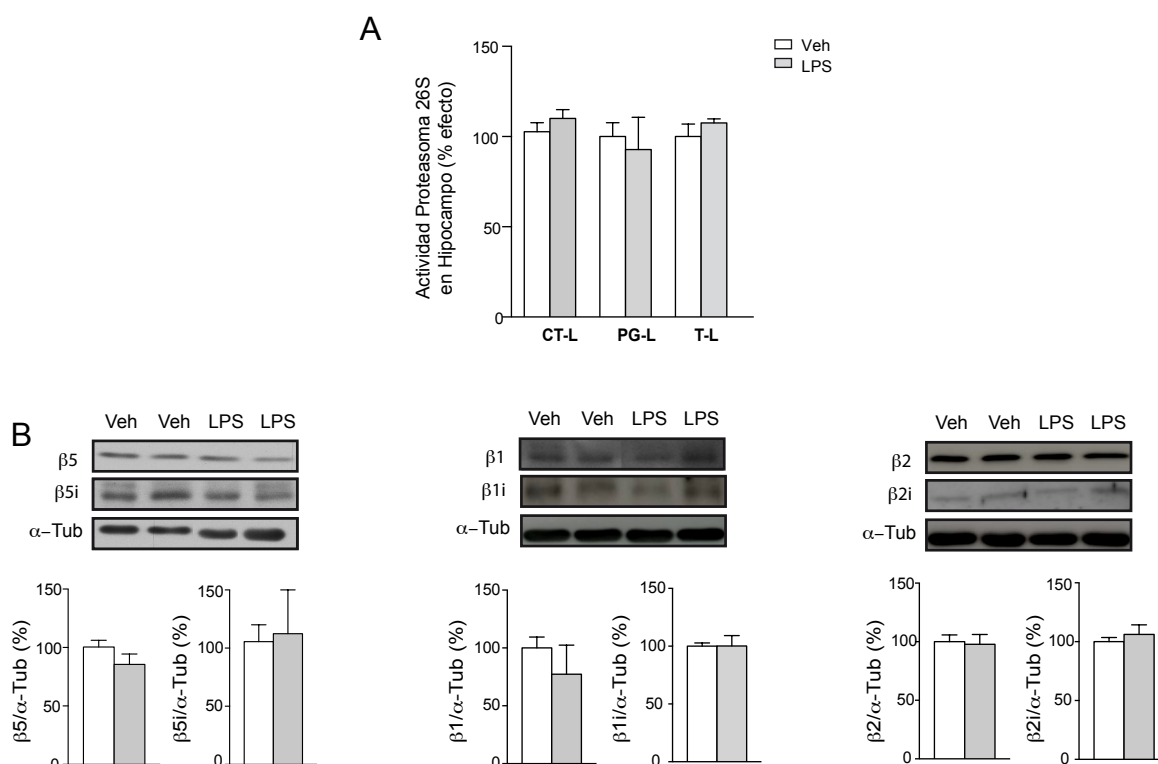
Basándonos en los resultados obtenidos anteriormente, donde observamos como la administración de LPS provoca un aumento de la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub>, decidimos analizar qué papel desempeña dicho receptor en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria inducida por la administración de LPS. Para ello se generó el ratón doble transgénico que además de expresar el reportero del UPS es carente del receptor P2Y<sub>2</sub> (Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>). La generación de dicho ratón se describe detalladamente en el apartado 1.6.2.3 de Materiales y Métodos. Ratones pertenecientes a los genotipos Ub<sup>G76V</sup>-GFP y Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>, fueron inyectados i.p con LPS y tras 48 horas de la administración se analizó el número de células que presentaban un acúmulo de reportero. Sorprendentemente, en los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> el número de células que presentaban un acúmulo de reportero tras el tratamiento (LPS: 13,80 ± 1,467 células verdes por 0,1 mm<sup>3</sup>) no fue significativamente distinto al observado en los ratones tratados con la solución vehículo (Veh: 16,96 ± 1,39 células verdes por 0,1 mm<sup>3</sup>) (Figura 41), presentando incluso cierta tendencia a la disminución de estas células.



**Figura 41.** La administración in vivo de en ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> no produce un aumento significativo en el número de células verdes. Detección del reportero Ub<sup>G76V</sup>-GFP (verde) mediante técnicas de IF en ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados i.p con solución vehículo o LPS 5 mg/Kg. El gráfico muestra la cuantificación del número de células que acumulan Ub<sup>G76V</sup>-GFP por 0,1 mm<sup>3</sup> en el hipocampo ipsilateral de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados.



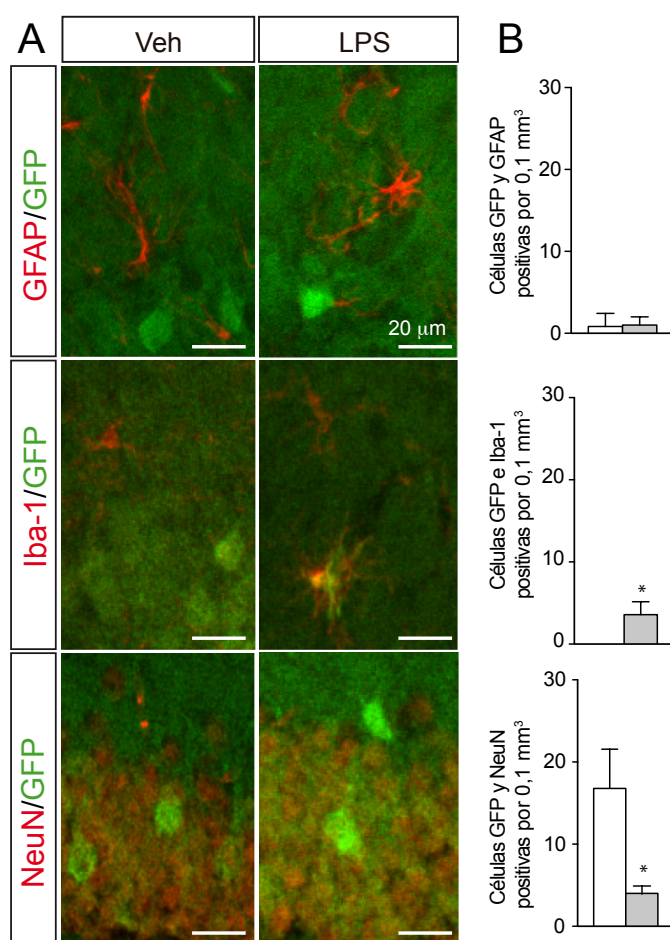
Tampoco se observaron modificaciones significativas en ninguna de las tres actividades catalíticas del proteasoma (CT-L  $110,1 \pm 4,88\%$ ; PG-L  $92,87 \pm 17,76\%$ ; T-L  $107,5 \pm 2,35\%$ ), (**Figura 42A**). Además, tampoco se observaron variaciones importantes en los niveles de expresión de las subunidades  $\beta$  y  $\beta i$  ( $\beta 5$   $79,49 \pm 9,213\%$ ;  $\beta 5i$   $112,4 \pm 47,15\%$ ;  $\beta 1$   $67,51 \pm 21,76\%$ ;  $\beta 1i$   $100,1 \pm 9,057\%$ ;  $\beta 2$   $97,87 \pm 8,378\%$ ;  $\beta 2i$   $106,2 \pm 8,205\%$ ), (**Figura 42B**).



**Figura 42. Efecto de la administración in vivo de LPS sobre las actividades proteolíticas del proteasoma en ratones  $Ub^{G76V}$ -GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>.** A) Medida de las actividades CT-L, PG-L y T-L en homogenados de hipocampo ipsilateral de ratones  $Ub^{G76V}$ -GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con LPS o solución vehículo B) Expresión de las subunidades catalíticas  $\beta$  constitutivas e inducibles junto a sus correspondientes autoradiogramas representativos. Como control de carga se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tub. Los datos están representados como la variación del porcentaje de actividad o de expresión, siendo el valor 100% los niveles de actividad o de expresión detectados en los ratones tratados con la solución vehículo. Todos los resultados representan la media  $\pm$  s.e.m de 4 experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

En último lugar se realizó un estudio morfológico con el fin de determinar cómo afectaba la carencia del receptor P2Y<sub>2</sub> al acúmulo de reportero  $Ub^{G76V}$ -GFP en los diferentes linajes neurales (**Figura 43**). Los resultados obtenidos mostraron que la administración de LPS en ratones  $Ub^{G76V}$ -GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> no modificaba significativamente

el número de astrocitos que presentaban un acúmulo de reportero respecto a los ratones  $Ub^{G76V}$ -GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con la solución vehículo (Veh  $0,833 \pm 0,654$ ; LPS  $1,0 \pm 0,5774$  número de células por  $0,1 \text{ mm}^3$ ). Sin embargo, sí se observó que la administración de LPS produjo un ligero, pero significativo aumento del número de microglías que presentaban una actividad del UPS alterada (Veh  $0,0 \pm 0,0$ ; LPS  $3,6 \pm 1,568$  número de células por  $0,1 \text{ mm}^3$ ). Además, de forma inesperada, se observó que la administración de LPS produjo una disminución significativa del número de neuronas que presentaban un acúmulo de reportero (Veh  $16,80 \pm 4,758$ ; LPS  $4,0 \pm 0,58$  número de células por  $0,1 \text{ mm}^3$ ). Estos resultados parecen indicar que el receptor P2Y<sub>2</sub> juega un papel crucial en la alteración del equilibrio de la proteostasis celular desencadenada por la administración de LPS.

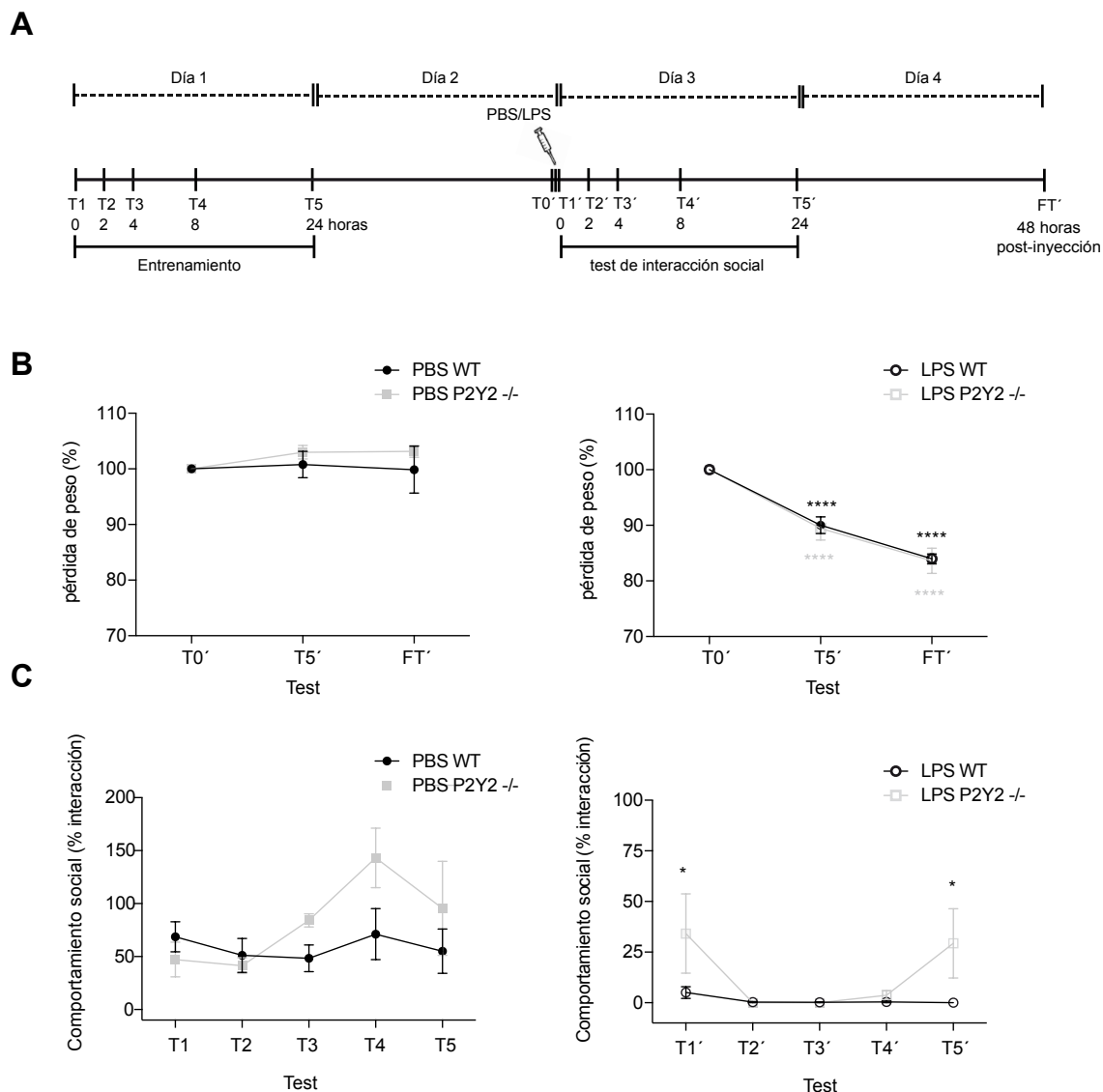


**Figura 43. Los diferentes linajes celulares acumulan  $Ub^{G76V}$ -GFP en ratones  $Ub^{G76V}$ -GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tras la administración con LPS.** A) Imágenes representativas mediante técnicas de IF del hipocampo de ratones  $Ub^{G76V}$ -GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con solución vehículo o LPS donde se representan la colocalización de células hipocampales que acumulan  $Ub^{G76V}$ -GFP (verde) con marcadores (rojo) de astrocitos (GFAP), microglia (Iba-1) y neuronas (NeuN). B) En los gráficos se detalla la cuantificación del número de células, (astrocitos, microglía y neuronas), que acumulan  $Ub^{G76V}$ -GFP. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m de al menos 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$

## 10. Los ratones carentes del receptor P2Y<sub>2</sub> tratados con LPS muestran una mayor interacción social

Varias publicaciones han reportado que la administración de LPS en ratones adultos produce alteraciones a nivel comportamental como anorexia, pérdida de peso y de funciones cognitivas así como disminución de interacción social (Godbout *et al* 2005, Henry *et al* 2008). En función de los datos obtenidos anteriormente, donde describimos que el receptor P2Y<sub>2</sub> parece jugar un papel clave en la alteración de la proteostasis celular inducida por la administración de LPS, quisimos comprobar si también este receptor juega un papel relevante en las alteraciones comportamentales asociadas a la administración de LPS. Para responder a esta cuestión analizamos los parámetros comportamentales de interacción social en ratones silvestres y ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tras ser tratados i.p con LPS a una dosis de 5 mg/Kg.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto los ratones silvestres como los ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con la solución vehículo (PBS) no mostraban variaciones significativas en cuanto a su peso corporal a lo largo del ensayo. Sin embargo, tanto los ratones silvestres como los ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con LPS mostraron una disminución significativa de su peso durante el proceso experimental. A este respecto, es importante destacar que la pérdida de peso no fue diferente entre ambos genotipos ni a las 24 horas (T5' WT: 90,02 ± 1,49%; P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>: 89,45 ± 2,09%), ni a las 48 horas (FT' WT: 83,99 ± 0,87%; P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>: 83,62 ± 2,26%) (**Figura 44B**). Sin embargo, hay que destacar que en cuanto al test comportamental, los ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con LPS mostraron una mayor interacción social que a los ratones silvestres tratados con LPS, tanto a tiempo cero (T1' WT 5,05 ± 2,89%; P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>: 34,15 ± 19,57%), como a las 48 horas postratamiento (T5' WT 0,0 ± 0,0%; P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>: 29,33 ± 17,11%) (**Figura 44C**).



**Figura 44. Efecto de la administración de LPS sobre la interacción social de ratones silvestres y P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>.** A) Diagrama seguido para la realización de los experimentos de comportamiento. T indica el número del test y FT el día que se procesa la muestra. B) Variación de peso en función del genotipo tras administración de la solución vehículo o LPS 5 mg/Kg C) Variación de la interacción social en función del genotipo tras administración de la solución vehículo o de LPS. Las siglas WT hacen referencia a los ratones silvestres. \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$

## 11. LPS y Suramina comparten el mismo mecanismo molecular para modificar la actividad del UPS

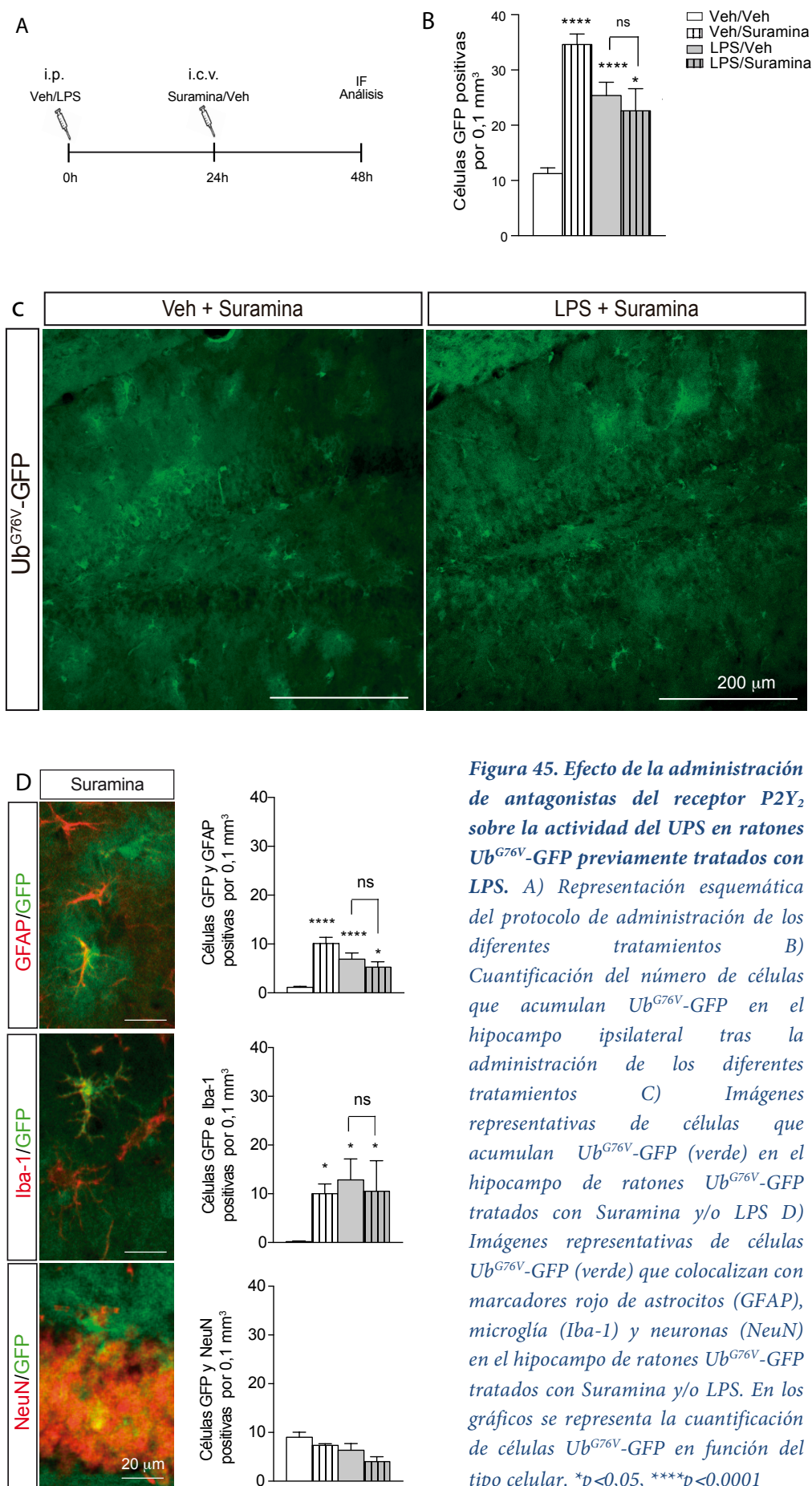
Con el fin de determinar si el receptor P2Y<sub>2</sub> es clave en el mecanismo molecular que subyace al acúmulo de reportero inducido por la administración de LPS, decidimos

estudiar qué efecto producía sobre la actividad del UPS la administración de un antagonista del receptor P2Y<sub>2</sub> como es la Suramina.

Como cabía esperar, a raíz de los resultados obtenidos en la línea celular N2a, la administración i.c.v de 2 µL de Suramina 1,5 mM a ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP adultos provocó un aumento del número de células que presentaban un acúmulo de reportero ( $34,62 \pm 1,91$  células por 0,1 mm<sup>3</sup>). Es de destacar, que dicho incremento fue incluso superior al producido por la administración i.p de LPS ( $25,39 \pm 2,40$  células por 0,1 mm<sup>3</sup>). Sin embargo, cuando los ratones fueron tratados conjuntamente con Suramina y LPS no se observó un efecto aditivo en cuanto al número de células que presentaban un acúmulo de reportero ( $22,63 \pm 3,98$  células por 0,1 mm<sup>3</sup>) (**Figura 45B y 45C**). La ausencia de un efecto aditivo entre ambos tratamientos se observó también al cuantificar el número de células gliales o neuronales que acumulaban reportero tras la administración conjunta de ambos compuestos (**Figura 45D**). Estos datos podrían indicar que ambos compuestos, Suramina y LPS, modulan la actividad del UPS mediante un mecanismo molecular común.

## 12. La activación del receptor P2Y<sub>2</sub> consigue modular el desequilibrio de la proteostasis celular producido por la administración de LPS

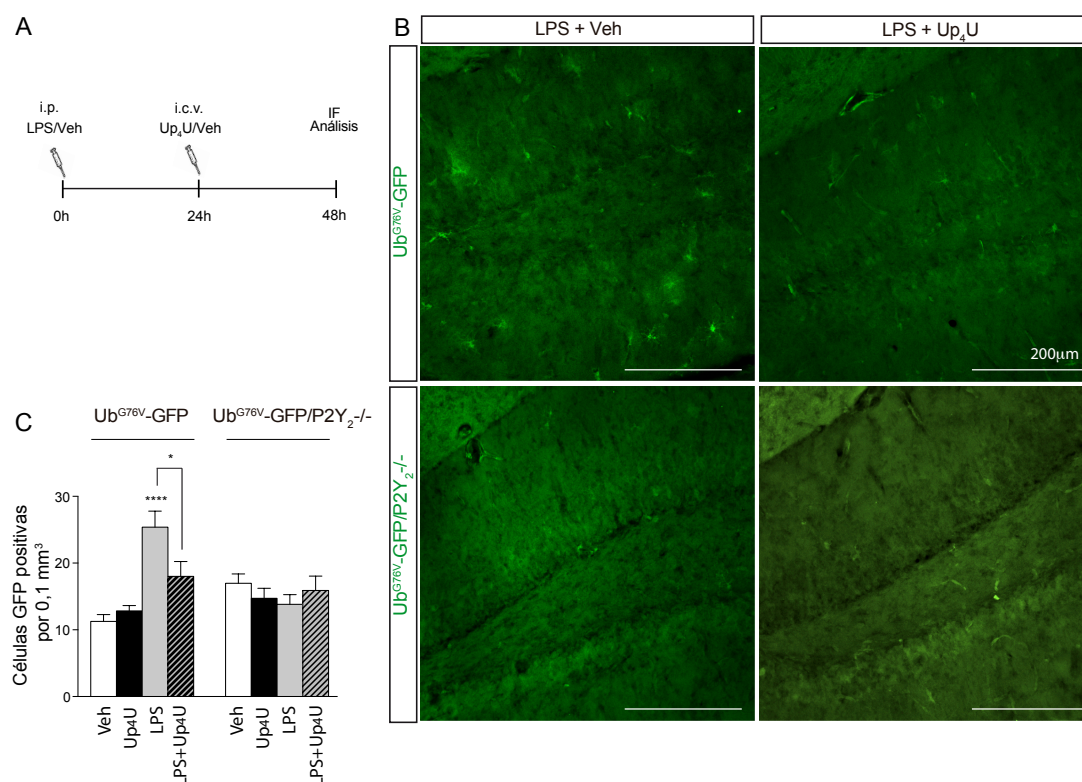
Basándonos en los resultados obtenidos en la línea celular N2a, donde habíamos observado que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> era capaz de modular positivamente la actividad del UPS, quisimos comprobar si la administración *in vivo* del agonista Up<sub>4</sub>U era capaz de regular el desequilibrio de la proteostasis celular inducido por la administración de la endotoxina. Para ello, ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP y Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>, tratados previamente i.p con la solución vehículo o LPS 5mg/Kg, fueron inyectados i.c.v con 2µL Up<sub>4</sub>U 45mM o la solución vehículo, siguiendo el protocolo descrito en la **Figura 46A**. Transcurridas 24 horas de la administración i.c.v, los ratones fueron sacrificados para ser analizados, mediante estudios de IF. En estos estudios se cuantificó el número de células que presentaban acúmulo del reportero Ub<sup>G76V</sup>-GFP.



**Figura 45. Efecto de la administración de antagonistas del receptor P2Y<sub>2</sub> sobre la actividad del UPS en ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP previamente tratados con LPS.** A) Representación esquemática del protocolo de administración de los diferentes tratamientos B) Cuantificación del número de células que acumulan Ub<sup>G76V</sup>-GFP en el hipocampo ipsilateral tras la administración de los diferentes tratamientos C) Imágenes representativas de células que acumulan Ub<sup>G76V</sup>-GFP (verde) en el hipocampo de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados con Suramina y/o LPS D) Imágenes representativas de células Ub<sup>G76V</sup>-GFP (verde) que colocalizan con marcadores rojo de astrocitos (GFAP), microglía (Iba-1) y neuronas (NeuN) en el hipocampo de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados con Suramina y/o LPS. En los gráficos se representa la cuantificación de células Ub<sup>G76V</sup>-GFP en función del tipo celular. \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$

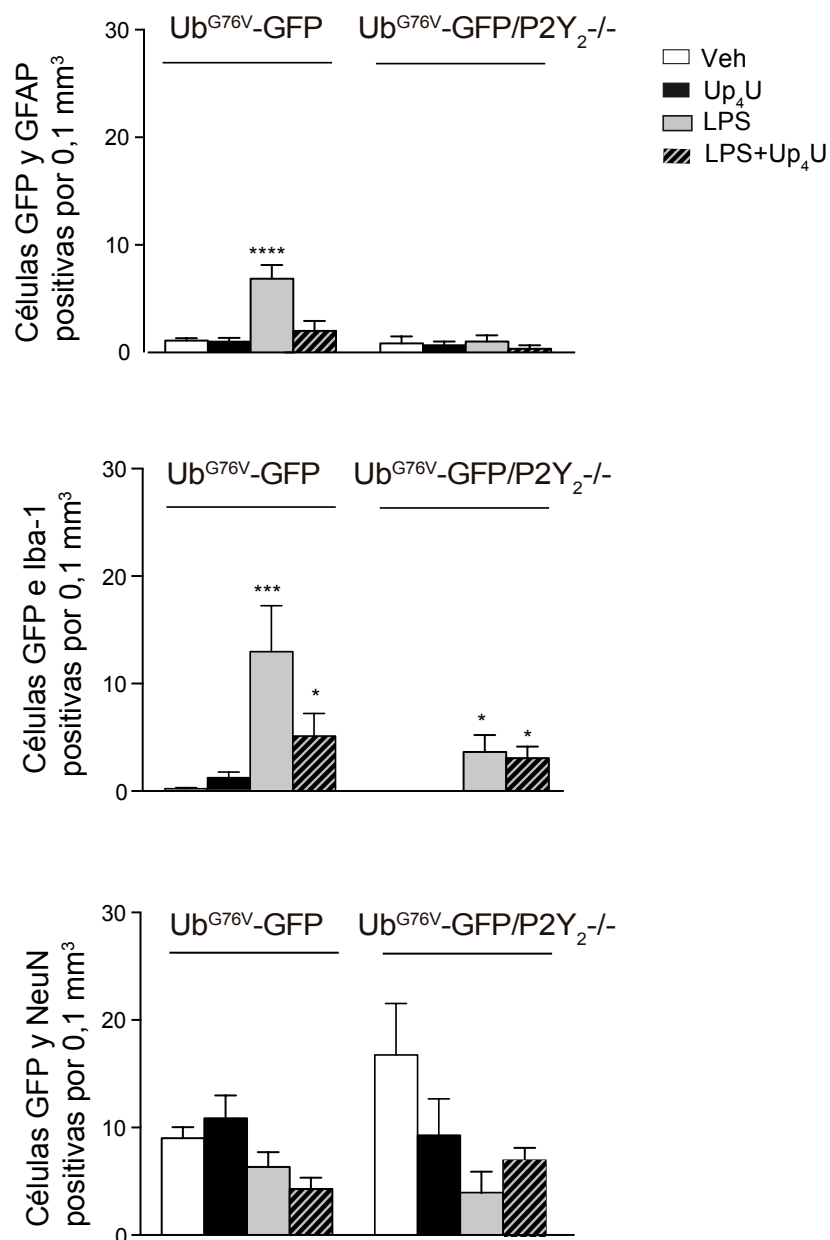


Como se muestra en la **Figura 46B y Figura 46C**, la administración i.c.v de Up<sub>4</sub>U redujo significativamente el número de células verdes inducido por la administración i.p de LPS (LPS 25,39 ± 2,40 células por 0,1 mm<sup>3</sup>; LPS+Up<sub>4</sub>U 18 ± 2,23 células por 0,1 mm<sup>3</sup>). Sin embargo, dado que en los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> la administración de LPS no produjo un aumento significativo en el número de células verdes, era de esperar que la administración conjunta de ambos compuestos tampoco modificara el número de células con una actividad alterada del UPS (LPS 13,80 ± 1,47 células por 0,1 mm<sup>3</sup>; LPS+Up<sub>4</sub>U 15,88 ± 2,18 células por 0,1 mm<sup>3</sup>).



**Figura 46. Efecto de la administración de Up<sub>4</sub>U en ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP y Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> previamente tratados con LPS sobre la actividad del UPS.** A) Representación esquemática del protocolo seguido para la administración de los diferentes tratamientos B) Imágenes representativas mediante técnicas de IF con anticuerpo anti-GFP para la detección de células que acumulan Ub-GFP (verde) en el hipocampo de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP y Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> previamente tratados con LPS y administrados con Up<sub>4</sub>U. C) Cuantificación del número de células que acumulan Ub<sup>G76V</sup>-GFP por 0,1 mm<sup>3</sup> en el hipocampo ipsilateral de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP y Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>. \*p<0,05, \*\*\*\*p<0,0001

De igual manera que en estudios anteriores, se realizó un análisis de la distribución de células verdes según su tipo celular (**Figura 47**).



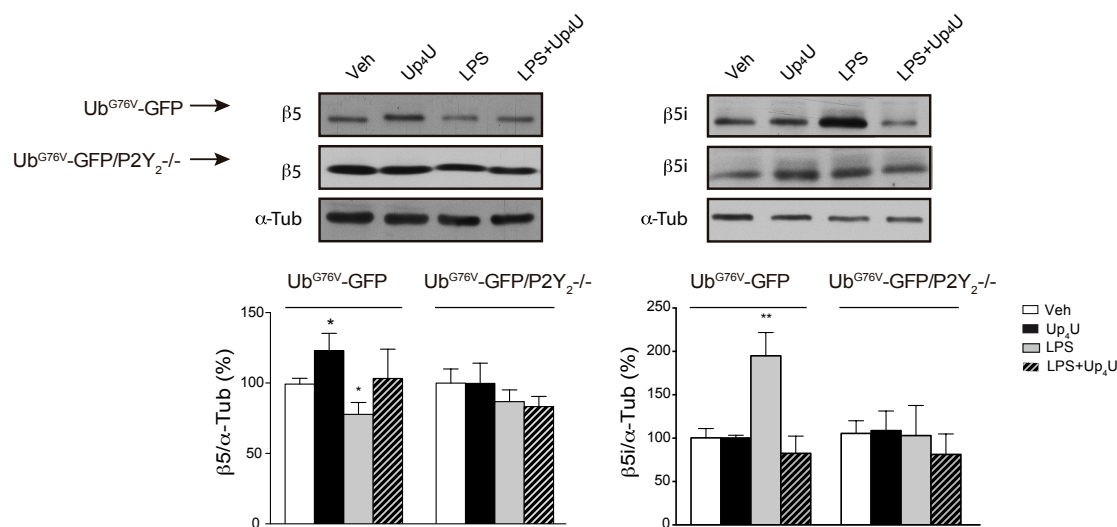
**Figura 47.** Cuantificación de células que acumulan Ub<sup>G76V</sup>-GFP tras la administración in vivo de Up<sub>4</sub>U en ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP y Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con LPS junto a su distribución en los diferentes linajes celulares hipocámpales. En los gráficos se detalla la cuantificación de los astrocitos (GFAP), microglía (Iba-1) y neuronas (NeuN) que acumulan Ub-GFP en el hipocampo ipsilateral de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP y Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con solución vehículo, Up<sub>4</sub>U, LPS y LPS combinado con Up<sub>4</sub>U. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m de al menos 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$



En dicho análisis se observó que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> en los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados con LPS produjo una disminución del número de astrocitos (LPS 6,867 ± 1,28 células por 0,1 mm<sup>3</sup>; LPS+Up<sub>4</sub>U 2,0 ± 0,93 células por 0,1 mm<sup>3</sup>) y microglías (LPS 12,86 ± 4,29 células por 0,1 mm<sup>3</sup>; LPS+Up<sub>4</sub>U 5,0 ± 2,13 células por 0,1 mm<sup>3</sup>) que presentaban un acúmulo de reportero. Sin embargo, la administración de Up<sub>4</sub>U en ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con LPS no produjo diferencias significativas en el número de astrocitos (LPS 1,0 ± 0,5774; LPS+Up<sub>4</sub>U 0,333 ± 0,33 células por 0,1 mm<sup>3</sup>) ni en el número de microglías (LPS 3,6 ± 1,57 células por 0,1 mm<sup>3</sup>; LPS+Up<sub>4</sub>U 3,0 ± 1,08 células por 0,1 mm<sup>3</sup>) que presentaban acúmulo de reportero con respecto a los detectados en aquellos ratones tratados con solución vehículo. Es importante resaltar que, si bien el tratamiento de los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP con Up<sub>4</sub>U y LPS redujo el número de microglías que presentan una actividad del UPS comprometida con respecto a los detectados en los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados con LPS, en ellos se siguen observando más células microgliales con acúmulo de reportero que en los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados con la solución vehículo. Además, también hay que mencionar que la administración de LPS a ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> indujo un incremento en el número de células microgliales que no fue reducido tras la administración de Up<sub>4</sub>U. Respecto al linaje neuronal, la administración de Up<sub>4</sub>U no produjo variaciones significativas en el número de neuronas con acúmulo de reportero en los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP ni en los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> previamente tratados con LPS.

Paralelamente a estos estudios morfológicos, también se analizaron los niveles de expresión de la subunidad β5 y β5i en ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP y en ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con LPS y Up<sub>4</sub>U (**Figura 48**). Estos análisis revelaron que la administración de LPS a ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP produjo una disminución significativa de la expresión de la subunidad β5 (LPS 77,72 ± 8,43%). Sin embargo, la administración de Up<sub>4</sub>U a ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados previamente con LPS, no indujo modificaciones significativas en los niveles de expresión de la subunidad β5 (LPS+Up<sub>4</sub>U 103,3 ± 20,72%), respecto a los niveles detectados en los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados con solución vehículo. En cuanto a la subunidad β5i se observó que el tratamiento de los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP con LPS indujo un aumento muy significativo de su expresión (194,9 ± 26,87%), mientras que en los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados conjuntamente con

LPS y Up<sub>4</sub>U no se observó dicho aumento ni tampoco modificaciones significativas con respecto a los niveles detectados en los ratones control ( $82,58 \pm 19,77\%$ ). Es de destacar que los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con Up<sub>4</sub>U y previamente administrados con LPS, no mostraron modificaciones significativas en los niveles de expresión de sus correspondientes subunidades  $\beta 5$  o  $\beta 5i$ .



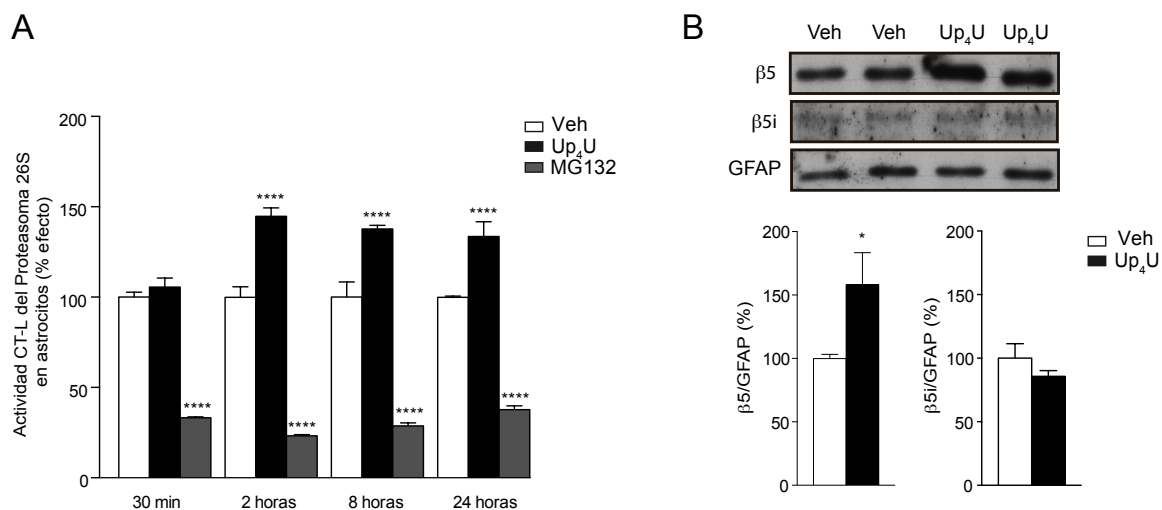
**Figura 48. Efecto de la administración in vivo de Up<sub>4</sub>U sobre la expresión de subunidades  $\beta/\beta i$  en ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP y Ub<sup>G76V</sup>-GFP/P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con LPS.** Autoradiogramas representativos de los niveles de expresión de las subunidades  $\beta$  constitutivas e inducibles. Como control de carga se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tub. Los datos representados en las gráficas corresponden a la variación del porcentaje de expresión de las diferentes subunidades, siendo el valor 100% los niveles de expresión detectados en los ratones fueron tratados con la solución vehículo. Todos los resultados representan la media  $\pm$  s.e.m de 4 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

### 13. Las quinasas Src y PI3K se encuentran implicadas en el efecto modulador que el receptor P2Y<sub>2</sub> ejerce sobre la actividad del UPS *in vivo*

De los resultados obtenidos en el apartado anterior se puede deducir que el receptor P2Y<sub>2</sub> juega un papel fundamental en el desequilibrio que el LPS induce sobre la proteostasis celular de los astrocitos. Con el fin de identificar los mecanismos moleculares implicados en dicho proceso, decidimos realizar un estudio más exhaustivo recurriendo para tal fin a la utilización de cultivos primarios de astrocitos hipocampales

procedentes de ratones silvestres. En la **Figura 49A** podemos observar cómo la estimulación de este tipo celular con Up<sub>4</sub>U 100  $\mu$ M produjo un aumento de actividad CT-L del UPS a partir de las 2 horas de la estimulación ( $144,9 \pm 7,55\%$ ), manteniéndose este efecto hasta las 24 horas ( $132,9 \pm 8,86\%$ ). Por el contrario, la administración del inhibidor del proteasoma MG132 produjo una inhibición de la actividad del UPS que se mantuvo hasta las 24 horas posteriores al tratamiento.

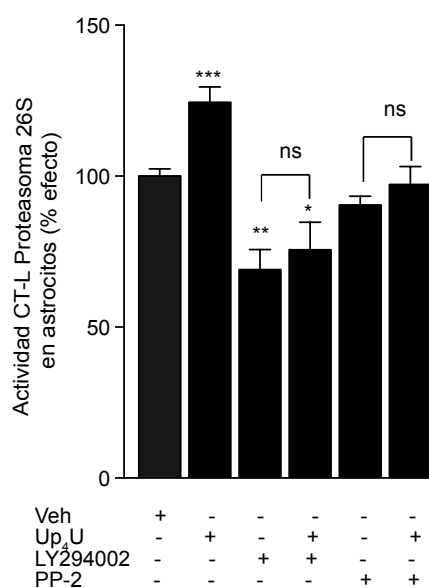
De forma análoga a lo observado en los estudios *in vivo*, la estimulación de los astrocitos en cultivo con Up<sub>4</sub>U durante 24 horas produjo un aumento de la expresión de la subunidad constitutiva  $\beta 5$  ( $158,3 \pm 25,08\%$ ), mientras que la expresión de la subunidad  $\beta 5i$  permaneció invariable (**Figura 49B**).



**Figura 49. Efecto de la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> en cultivos primarios de astrocitos** A) Medida de la actividad CT-L en cultivos primarios de astrocitos a diferentes tiempos B) Expresión de las subunidades  $\beta 5$  y  $\beta 5i$  en cultivos primarios de astrocitos tras estimulación con Up<sub>4</sub>U 100  $\mu$ M. Los gráficos representan el porcentaje de variación de actividad o de expresión de las subunidades, siendo el valor 100% los niveles de expresión o actividad detectados cuando los astrocitos fueron tratados con la solución vehículo. Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  s.e.m de al menos 4 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Como control de carga se utilizó la proteína GFAP. \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$

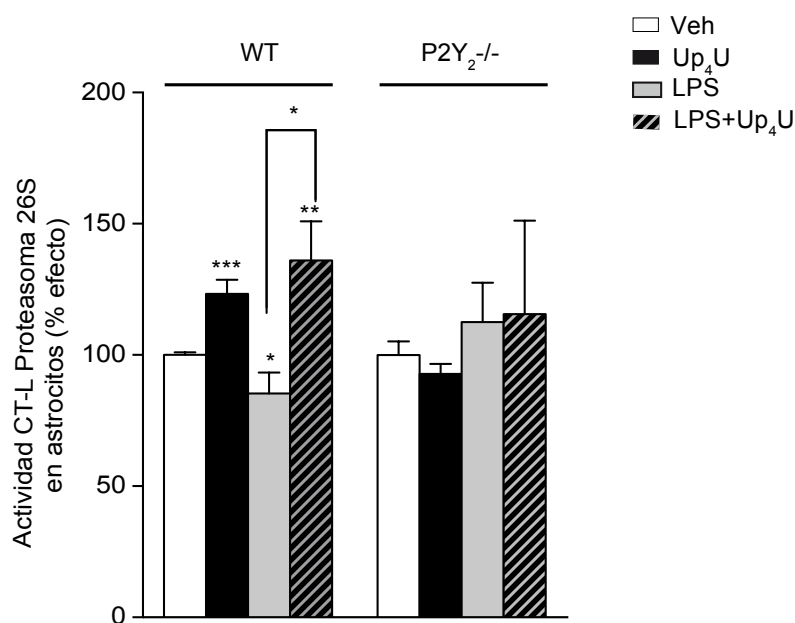
En los experimentos realizados en la línea celular N2a habíamos descrito que la quinasas PI3K se encuentra implicada en la ruta de señalización intracelular por la cual el receptor P2Y<sub>2</sub> modula la actividad del UPS. Basándonos en estos resultados, los astrocitos en cultivo fueron tratados con el inhibidor selectivo de PI3K (LY294002 50

$\mu\text{M}$ ), para posteriormente medir la actividad CT-L del proteasoma. Los resultados obtenidos mostraron cómo la presencia de este inhibidor redujo significativamente la actividad CT-L ( $69,03 \pm 6,655\%$ ). Además, esta disminución de actividad se mantuvo cuando los astrocitos fueron co-estimulados con el agonista  $\text{Up}_4\text{U}$   $100 \mu\text{M}$  ( $75,59 \pm 9,115\%$ ) confirmando, de esta manera, la implicación de esta quinasa en la ruta de señalización intracelular activada por el receptor  $\text{P2Y}_2$ . Por otro lado, ya hemos comentado que el receptor  $\text{P2Y}_2$  posee dos dominios SH3 en su extremo C-terminal (Liu *et al* 2004), y que la activación de Src a través de  $\text{P2Y}_2$  puede desencadenar a su vez la activación de PI3K y ERK1/2 (Weisman *et al* 2012). Por esta razón, se decidió utilizar el inhibidor de las Src-tirosina quinasas, PP-2 ( $2 \mu\text{M}$ ). En presencia de este inhibidor, que no modificó basalmente la actividad CT-L de los astrocitos ( $90,46 \pm 2,887\%$ ), tampoco se observó el aumento de actividad CT-L inducida por el agonista  $\text{Up}_4\text{U}$  ( $97,23 \pm 5,948\%$ ), confirmándose así la implicación de esta quinasa en dicho proceso (**Figura 50**).



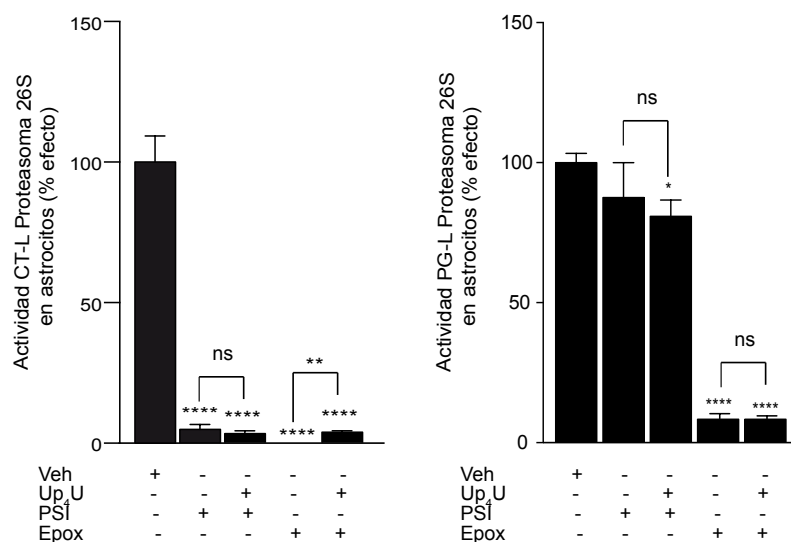
**Figura 50. Las quinasas PI3K y Src se encuentran implicadas en la ruta de transducción del receptor  $\text{P2Y}_2$  astroglial.** Medida de la actividad CT-L en cultivos primarios de astrocitos para la identificación de la ruta de señalización intracelular implicada tras la activación del receptor  $\text{P2Y}_2$ . La gráfica representa el porcentaje de variación de la actividad del UPS, siendo el valor 100% la actividad detectada cuando los astrocitos fueron tratados con la solución vehículo. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m de al menos 4 cultivos independientes realizados por cuadruplicado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

Puesto que en experimentos anteriores hemos descrito que la administración *in vivo* de Up<sub>4</sub>U consigue modular el desequilibrio de la proteostasis celular producido por la administración de LPS, quisimos comprobar si este efecto se reproducía en el linaje celular glial, en concreto en los astrocitos. Para ello, se midió la actividad CT-L en astrocitos de hipocampo en cultivo procedentes de ratones silvestres y ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> después de ser sometidos a los diferentes tratamientos. En la **Figura 51** podemos observar como en los astrocitos hipocampales procedentes de ratones silvestres tratados con LPS se produjo una disminución significativa de la actividad CT-L del UPS ( $85,32 \pm 7,934\%$ ). Dicha inhibición fue revertida cuando los astrocitos fueron co-estimulados con Up<sub>4</sub>U ( $136 \pm 14,90\%$ ). Hay que destacar que la estimulación de las células con el dinucleótido Up<sub>4</sub>U también produjo un aumento de la actividad CT-L ( $123,2 \pm 5,349\%$ ). Sin embargo, la administración de LPS y/o el Up<sub>4</sub>U en los astrocitos procedentes de ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>, no indujo modificaciones significativas en la actividad CT-L tras dichos tratamientos ( $115,5 \pm 35,61\%$ ).



**Figura 51. Efecto de la administración de Up<sub>4</sub>U sobre la actividad catalítica del proteasoma en cultivos primarios de astrocitos previamente tratados con LPS.** Medida de la actividad CT-L en cultivos primarios de astrocitos hipocampales procedentes de ratones silvestres y ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup>. El gráfico representa el porcentaje de variación de la actividad del UPS, siendo el valor 100% la actividad detectada cuando los astrocitos fueron tratados con la solución vehículo. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m de al menos 4 cultivos independientes realizados por cuadruplicado. Las siglas WT hacen referencia a los ratones silvestres. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

En anteriores aproximaciones experimentales realizadas en la línea celular N2a habíamos descrito que el Up<sub>4</sub>U consigue minimizar el efecto citotóxico o el acúmulo de reportero inducido por el inhibidor reversible del proteasoma MG132 (**Figura 27A y 27B**). Basándonos en estos resultados, quisimos comprobar el efecto que producía la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> en cultivos primarios de astrocitos hipocampales previamente tratados con otros inhibidores del proteasoma. En la **Figura 52** se observa cómo el tratamiento de los astrocitos hipocampales con el inhibidor irreversible del proteasoma PSI 0,1nM, (que actúa específicamente sobre la actividad de la subunidad β5), abolió por completo la actividad CT-L ( $4,983 \pm 0,9613\%$ ), mientras que no modificó significativamente la actividad PG-L ( $87,5 \pm 12,50\%$ ). La inhibición de ambas actividades no fue modificada por el tratamiento combinado de PSI y Up<sub>4</sub>U 100 μM. Por otro lado, cuando los astrocitos fueron tratados con el inhibidor irreversible del proteasoma Epoxomicina 5 μM, (que actúa bloqueando las tres actividades catalíticas), se observó una inhibición completa de las actividades CT-L y PG-L del proteasoma (CT-L:  $0,0 \pm 0,0\%$ ; PG-L:  $8,33 \pm 0,3\%$ ). Sin embargo, en este caso, la administración conjunta de Epoxomicina y Up<sub>4</sub>U produjo un aumento significativo de la actividad CT-L ( $3,8 \pm 0,5485\%$ ), aunque no modificó la actividad PG-L ( $8,33 \pm 0,2\%$ ).

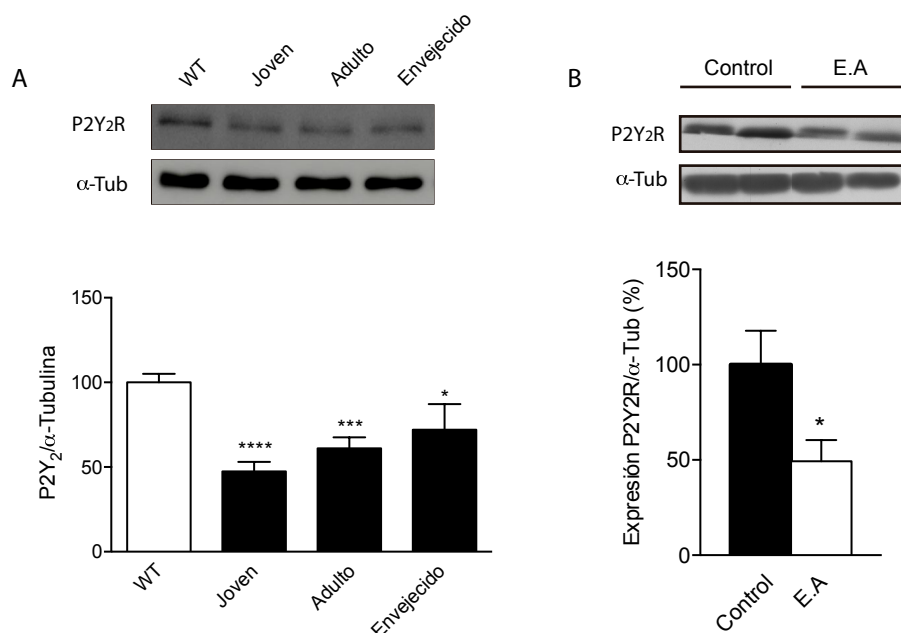


**Figura 52. Efecto de la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> sobre la acción de diferentes inhibidores del proteasoma en cultivos primarios de astrocitos hipocampales. Medida de la actividad CT-L y PG-L del proteasoma tras la estimulación con los inhibidores del proteasoma Epoxomicina y PSI. El gráfico representa el porcentaje de variación de la actividad del UPS, siendo el 100% la actividad cuando los astrocitos fueron tratados con la solución vehículo. Los datos representan la media  $\pm$  s.e.m de al menos 4 cultivos independientes realizados por cuadruplicado. \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$**

#### **14. Durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer se produce una correlación entre la disminución de la actividad del UPS y la disminución de la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub>**

Una vez observado que tras un estímulo proinflamatorio las células gliales del hipocampo experimentan un aumento de la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub>, posiblemente para compensar la alteración de la proteostasis celular inducida por el dicho estímulo, decidimos estudiar si un proceso similar también tiene lugar en un contexto patológico más complejo como es la enfermedad de Alzheimer (E.A). Para abordar esta cuestión, decidimos generar el ratón doble transgénico modelo de la enfermedad de Alzheimer y que además expresa el reportero de la actividad del UPS (Ub<sup>G76V</sup>-GFP/J20). Estos ratones fueron generados siguiendo el protocolo que se describe en el apartado 1.6.2.5 de Materiales y Métodos. Una vez generados, los ratones fueron estudiados a diferentes edades: ratón joven que comprende edades entre los 3 y 6 meses; ratón adulto entre los 6 y 12 meses de edad y ratones envejecidos con edades superiores a los 12 meses y hasta los 20-22 meses.

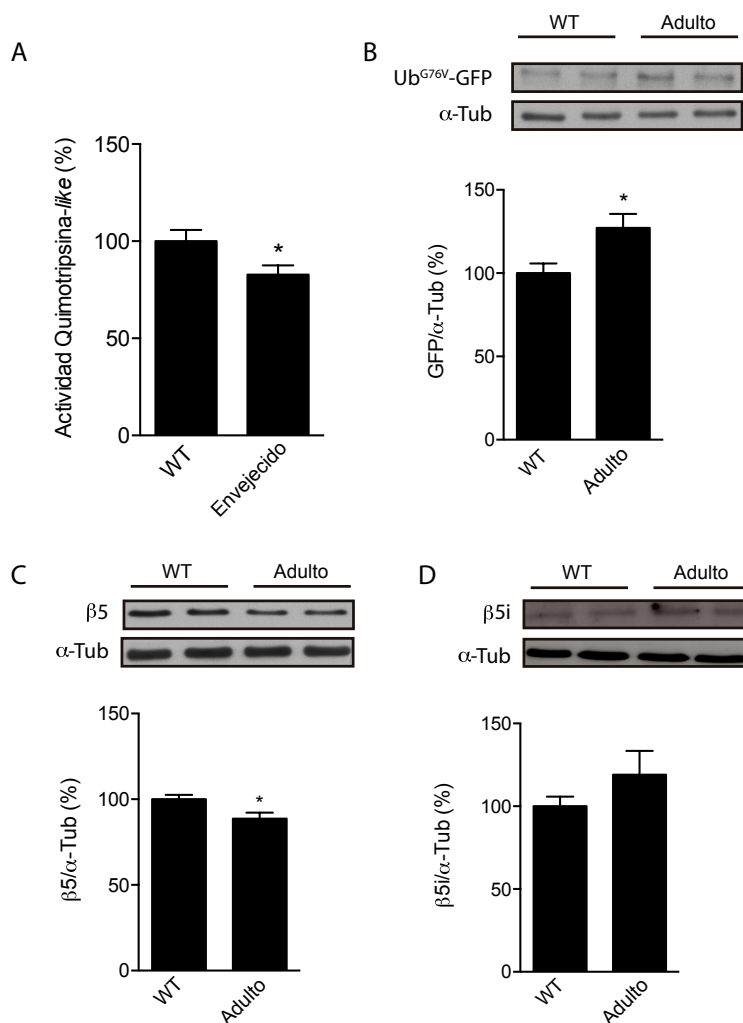
En un primer paso, se analizaron los niveles de expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en los ratones dobles transgénicos Ub<sup>G76V</sup>-GFP/J20 de diferentes edades. Como podemos observar en la **Figura 53A**, ya en los primeros estadios de la enfermedad se produjo una disminución de la expresión del receptor ( $47,42 \pm 5,64\%$ ), manteniéndose esta bajada hasta estadios patológicos más avanzados ( $72,10 \pm 12,32\%$ ). Gracias a la disponibilidad de muestras *postmortem* procedentes de pacientes diagnosticados de la E.A, también pudimos comprobar que en dichas muestras se producía una disminución de hasta un 50% de la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> con respecto a los niveles detectados en sus correspondientes controles (**Figura 53B**).



**Figura 53. Expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer** A) Expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en extractos de hipocampo de ratones transgénicos J20 de diferentes edades. B) Expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en muestras corticales postmortem procedentes de pacientes diagnosticados de la enfermedad de Alzheimer. Los gráficos representan el porcentaje de expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> y se corresponden con la media  $\pm$  s.e.m de al menos 3 experimentos independientes. Como control de carga se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tub. Las siglas WT hacen referencia a los ratones silvestres \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$

Posteriormente, se procedió a medir la actividad CT-L en el hipocampo procedente del grupo de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/J20 envejecidos. Los estudios realizados mostraron que se produjo una disminución significativa de dicha actividad en los ratones J20 ( $82,81 \pm 4,69\%$ ), comparado con sus respectivos controles Ub<sup>G76V</sup>-GFP (**Figura 54A**). Esta disminución de la actividad CT-L se correlacionaba con un incremento en los niveles de Ub<sup>G76V</sup>-GFP en los ratones J20 adultos ( $127,1 \pm 8,49\%$ ), (**Figura 54B**). En un segundo paso, se analizó la expresión de las subunidades  $\beta 5$  y  $\beta 5i$ , observándose que, por un lado se producía una disminución significativa de la expresión de la subunidad  $\beta 5$  constitutiva ( $88,69 \pm 3,45\%$ ), mientras que por otro lado se produjo un aumento, aunque no significativo, de la expresión de la subunidad  $\beta 5i$  ( $119 \pm 14,47\%$ ), (**Figura 54C y 54D**).



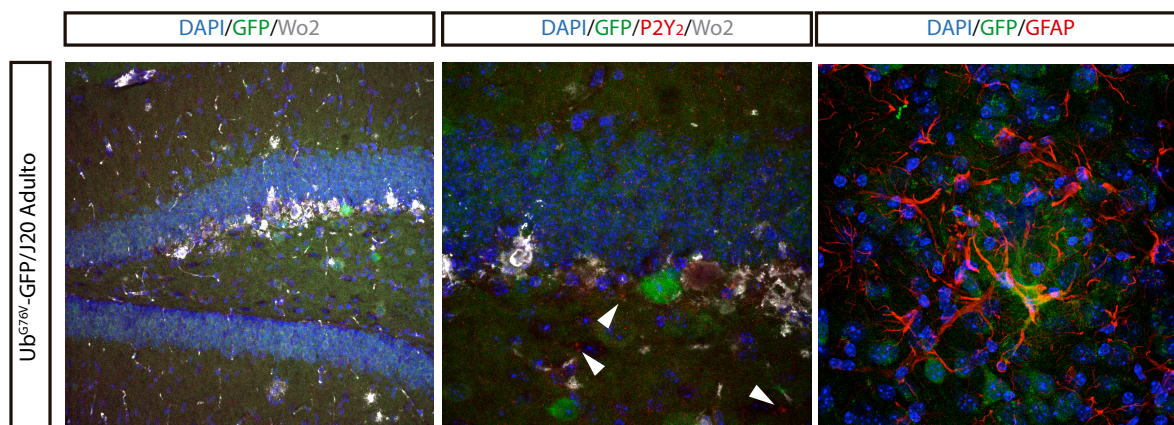


**Figura 54. Funcionalidad del proteasoma en el hipocampo de ratones silvestres y ratones J20 de diferentes edades.** A) Medida de la actividad CT-L en ratones silvestres y ratones J20 envejecidos B) Expresión de la proteína reportera Ub-GFP en ratones silvestres y ratones J20 adultos C) Expresión de la subunidad  $\beta$ 5 del proteasoma en ratones silvestres y ratones J20 adultos D) Expresión de la subunidad  $\beta$ 5i del proteasoma en ratones silvestres y ratones J20 adultos. Los gráficos representan el porcentaje de variación de actividad y/o expresión de cada subunidad, siendo el 100% el porcentaje de expresión o actividad correspondiente al ratón silvestre de la misma edad. Los datos corresponden a la media  $\pm$  s.e.m de al menos 4 experimentos independientes. Las siglas WT hacen referencia a los ratones silvestres \* $p < 0,05$

A continuación, y mediante análisis morfológico, pudimos comprobar que los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/J20 adultos mostraban un importante número de células que acumulaban reportero. Curiosamente, aquellas células que mostraban un mayor acúmulo de reportero Ub<sup>G76V</sup>-GFP en el hipocampo de ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/J20 no

expresaban el receptor P2Y<sub>2</sub>, lo cual parece indicar nuevamente que el receptor P2Y<sub>2</sub> juega un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio proteostático celular.

Finalmente, también pudimos identificar que algunas de las células que presentaban un acúmulo de reportero pertenecían al linaje astrogial (**Figura 55**).



**Figura 55.** Expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> en secciones coronales de hipocampo procedentes de ratones *Ub<sup>G76V</sup>-GFP/J20* adultos. El panel izquierdo muestra una imagen de células hipocámpales que acumulan Ub-GFP (verde) teñidas mediante IF con marcadores nucleares DAPI (azul) y placas de β-amiloide (anticuerpo Wo2, en gris). El panel central muestra una imagen a mayor aumento del asta dorsal del hipocampo teñida mediante IF con marcadores nucleares DAPI (azul), Ub-GFP (verde), P2Y<sub>2</sub> (rojo), placas β-amiloide (gris). El panel derecho muestra una imagen de alto aumento de una sección cortical teñida mediante IF con marcadores nucleares DAPI (azul), Ub<sup>G76V</sup>-GFP (verde), marcador astrocitos (rojo).

## *DISCUSIÓN*

---

## 1. EFECTO MODULADOR DE LOS NUCLEÓTIDOS EXTRACELULARES SOBRE LA ACTIVIDAD DEL UPS

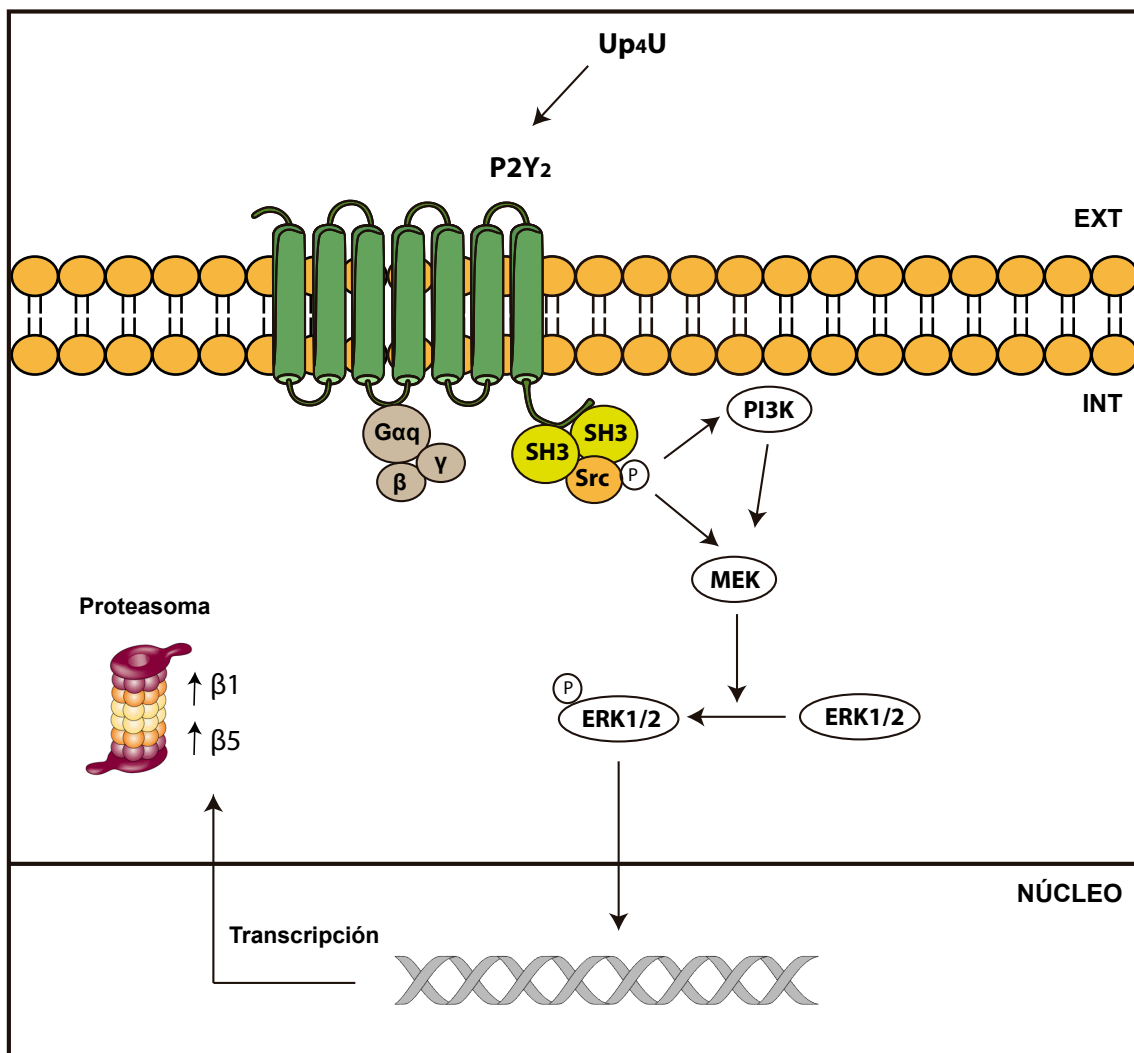
Los estudios farmacológicos realizados en la línea celular N2a que expresan las proteínas reporteras del UPS, Ub<sup>G76V</sup>-YFP o GFP-CL1, revelaron que diferentes agonistas endógenos del receptor P2Y<sub>2</sub>, como son el UTP y el Up<sub>4</sub>U, ejercen un efecto potenciador de la actividad del UPS. Es importante destacar que las concentraciones empleadas de ambos agonistas en los ensayos farmacológicos se encuentran dentro del rango de concentración que los nucleótidos pueden alcanzar en la hendidura sináptica bajo condiciones fisiológicas (Pankratov *et al* 2006). La implicación del receptor P2Y<sub>2</sub> en el efecto modulador que el Up<sub>4</sub>U ejerce sobre el UPS fue confirmada gracias a la utilización de técnicas tanto farmacológicas, empleando diferentes antagonistas de los receptores P2Y, como de Biología Molecular, incluyendo el silenciamiento selectivo del receptor P2Y<sub>2</sub> mediante ARN de interferencia.

Gracias al empleo de sustratos fluorogénicos específicos para medir la actividad del proteasoma, pudimos determinar que la reducción de los niveles del reportero del UPS inducida por la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> era debida a un incremento en las actividades catalíticas CT-L y PG-L del proteasoma. Este aumento en las actividades proteolíticas se correlacionó a su vez con un aumento de expresión de las subunidades catalíticas constitutivas  $\beta$ 5 y  $\beta$ 1. Es importante recalcar que, si bien se produjo un aumento de la expresión de estas subunidades, éste no se vio acompañado de un incremento en la biogénesis proteasomal. Además, pudimos comprobar que la disminución de los niveles de reportero tampoco fue debida a alteraciones traduccionales o transcripcionales de las proteínas reporteras utilizadas. Estos resultados parecen estar indicando que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> induce un incremento de la expresión de las subunidades catalíticas  $\beta$ 5 y  $\beta$ 1, lo cual provoca a su vez un incremento en las actividades CT-L y PG-L del proteasoma, conduciendo finalmente a una degradación más eficiente de dichas proteínas reporteras.

Los estudios farmacológicos realizados para identificar la ruta de señalización intracelular por la cual el receptor P2Y<sub>2</sub> modifica la expresión de las subunidades catalíticas del proteasoma, revelaron que en dicha ruta estaban implicadas las quinasas

PI3K y ERK1/2. Aunque diferentes grupos han descrito que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> moviliza las proteínas quinasas PKC o PKA (Abbracchio *et al* 2006, Weisman *et al* 2012b), en nuestro modelo experimental no encontramos que estas quinasas se encontraran implicadas en el efecto que P2Y<sub>2</sub> induce sobre el UPS. En este mismo sentido, otros grupos también han descartado la implicación de estas quinasas en la señalización asociada a dicho receptor (Arthur *et al* 2006a). Esta versatilidad en la ruta de señalización intracelular asociada a P2Y<sub>2</sub> se puede deber a sus características estructurales como son la presencia de dos dominios de unión SH3 en el extremo C-terminal intracelular (Liu *et al* 2004), así como un dominio RGD presente en el primer bucle extracelular. Teniendo en cuenta que: (1) la interacción de Src con los dominios SH3 presentes en el extremo C-terminal del receptor P2Y<sub>2</sub> puede desencadenar la activación de PI3K y ERK1/2 (Arthur *et al* 2006a, Weisman *et al* 2012a), (2) el dominio RGD cumple una función importante en la activación de ERK1/2 (Liu *et al* 2004), y (3) ERK1/2 cataliza la fosforilación de cientos de sustratos nucleares como moléculas reguladoras y factores de transcripción (Roskoski 2012), podemos postular que el incremento de expresión de las subunidades del proteasoma  $\beta$ 1 y  $\beta$ 5 inducidas por P2Y<sub>2</sub> puede estar mediada por la ruta de señalización Src/PI3K/MEK/ERK, tal y como se muestra en la **Figura 56**.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro modelo celular, la administración intracerebroventricular (i.c.v.) del dinucleótido Up<sub>4</sub>U indujo un incremento de las actividades del proteasoma CT-L y PG-L en el hipocampo de los ratones silvestres. Además, este aumento también estuvo acompañado de un incremento de la expresión de las subunidades catalíticas  $\beta$ 5 y  $\beta$ 1 del proteasoma. La ausencia de modificaciones tanto en las actividades catalíticas como en la expresión de las subunidades constitutivas del proteasoma en el hipocampo de ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados i.c.v. con Up<sub>4</sub>U, confirmó definitivamente la implicación del receptor P2Y<sub>2</sub> en los efectos *in vivo* inducidos por dinucleótido.



**Figura 56. Representación esquemática de la ruta de señalización del receptor P2Y<sub>2</sub> a través de la cual modula la actividad del UPS**

Diversos estudios han postulado que el receptor P2Y<sub>2</sub> puede jugar un papel neuroprotector en diferentes condiciones patológicas como la neuroinflamación, estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas (Weisman *et al* 2012a). Es de destacar que en estas condiciones patológicas también se produce una alteración de la actividad del proteasoma (Dantuma & Lindsten 2010). En estos estudios se postuló que una respuesta adecuada del UPS puede ser fundamental para controlar la proteostasis celular y promover la supervivencia celular en condiciones de estrés oxidativo (Bence *et al* 2001, Hershko & Ciechanover 1998, Lindsten & Dantuma 2003). De acuerdo con esta hipótesis, también se ha reportado que un incremento en la expresión de las subunidades que conforman el complejo regulador 19S proporciona una mayor

resistencia al estrés oxidativo y prolonga la esperanza de vida de ratones sometidos a diferentes estímulos que inducen estrés oxidativo (Vilchez *et al* 2012). Considerando que también se ha sugerido que una activación del receptor P2Y<sub>2</sub> es crucial para la supervivencia celular en condiciones oxidativas (Ahmad *et al* 2004), es lógico pensar que la regulación del UPS a través del receptor P2Y<sub>2</sub> puede constituir el mecanismo molecular por el cual dicho receptor ejerce su efecto neuroprotector. Aunque en nuestro modelo experimental no observamos cambios significativos en los niveles de expresión de las subunidades del complejo regulador 19S, sí que observamos que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> produce un incremento en la expresión de la subunidad constitutiva β5. De acuerdo con datos obtenidos en nuestro modelo experimental, se ha descrito que la sobreexpresión de la subunidad β5 potencia la supervivencia de células sometidas a estímulos oxidantes (Chondrogianni *et al* 2005).

## 2. EL RECEPTOR P2Y<sub>2</sub> JUEGA UN PAPEL CLAVE EN LA ALTERACIÓN DE LA PROTEOSTASIS CELULAR INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE LPS

Existe cierta controversia en cuanto a cómo un estímulo proinflamatorio puede afectar a la actividad del UPS. Por un lado, se ha reportado que el LPS como estímulo proinflamatorio induce una disminución de la actividad del proteasoma (Jamart *et al* 2014). Sin embargo, otros trabajos han reportado que el mismo estímulo proinflamatorio desencadena un incremento en las actividades catalíticas del proteasoma (Pla *et al* 2014). Inicialmente, en nuestro modelo experimental no observamos que la administración intraperitoneal de LPS produjera modificaciones significativas en las actividades proteolíticas del proteasoma medidas en los extractos de hipocampo de ratones silvestres así tratados. Sin embargo, y teniendo en cuenta la heterogeneidad celular de la muestra analizada, existía la posibilidad en la que si el LPS sólo afectase a la proteostasis de un pequeño porcentaje de células, este efecto quedase diluido y por lo tanto fuese imposible detectar cambios en la proteostasis celular mediante este abordaje experimental. Para evitar esta posible deficiencia, se utilizaron los ratones reporteros del UPS (ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP o también denominados ratones

U1), los cuales permiten detectar alteraciones del proteasoma a nivel celular (Hernandez *et al* 2004, Lindsten *et al* 2003). Aunque nuevamente no se detectaron variaciones significativas en las actividades catalíticas del proteasoma, sí que se encontró que la administración de LPS produjo un importante acúmulo de reportero Ub-GFP en una población de células del hipocampo que pertenecían principalmente al linaje glial. Dado que se ha descrito que para que se produzca un acúmulo detectable del reportero Ub-GFP en estos ratones es necesario que la actividad proteolítica del proteasoma se encuentre disminuida hasta en un 80% (Dantuma *et al* 2000, Kessler *et al* 2003), interpretamos que el acúmulo de reportero inducido por LPS es debido a que en dichas células se está produciendo una disminución muy significativa de la actividad catalítica del proteasoma. El hecho de que este fenómeno tenga lugar en los principales efectores celulares implicados en la respuesta inflamatoria, como son las células microgliales y astrogiales (Yamasaki *et al* 2014), sugiere que la alteración de la proteostasis celular en estas células puede ser un fenómeno relevante en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. Hay que tener en cuenta que en los primeros estadios de la neuroinflamación, tanto la astrogliosis como la formación de la cicatriz glial presentan funciones neuroprotectoras, ya que favorecen el aislamiento de la zona dañada de otros agentes infecciosos (Abbracchio *et al* 1999). Sin embargo, una astrogliosis sostenida en el tiempo podría exacerbar la respuesta frente a un segundo estímulo proinflamatorio, lo que podría contribuir a la progresión y agravamiento del cuadro neuroinflamatorio asociado a diferentes condiciones neuropatológicas. En este sentido, nuestros resultados indican que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> tendría un efecto modulador negativo sobre la astrogliosis asociada a la administración de LPS. De tal manera, que la administración de Up<sub>4</sub>U revertiría la alteración proteostasis inducida por la endotoxina en las células astrogiales. Sin embargo, en el caso de la microglía, aunque la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> también redujo el número de microglías con una actividad del UPS alterada, no evitó que un número significativo de ellas presentaran una actividad anómala del UPS. La alta susceptibilidad que poseen los astrocitos al efecto proinflamatorio inducido por LPS se vio también reflejado en los estudios realizados con astrocitos en cultivo. En estos ensayos se demostró, que tras ser estimulados con LPS, los astrocitos sufren una disminución significativa de la actividad CT-L del proteasoma. Esta disminución fue revertida cuando los astrocitos fueron tratados con Up<sub>4</sub>U.



Por otro lado, el tratamiento con LPS también produjo un incremento significativo de la expresión hipocampal del receptor P2Y<sub>2</sub>. Este incremento podría estar relacionado con el importante papel que este receptor parece desempeñar en determinados procesos neuroinflamatorios (Weisman *et al* 2012a). No debemos olvidar que la concentración de ATP en el foco inflamatorio puede alcanzar concentraciones en el rango de milimolar (Bours *et al* 2011). Así, se ha descrito que la neuroinflamación inducida por LPS no sólo produce un incremento en la expresión de dicho receptor en macrófagos, sino que también se observa un incremento en la secreción de los mediadores proinflamatorios PGE<sub>2</sub> y COX-2 mediada por la activación de este receptor (Eun *et al* 2014). Además, la activación de P2Y<sub>2</sub> presente en células endoteliales potencia la migración transendotelial (TEM) de neutrófilos inducida por LPS, proceso necesario para incrementar la población microglial residente en procesos neurodegenerativos (Kukulski *et al* 2010). Un análisis más detallado de los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP tratados con LPS reveló que, la mayoría de las células que expresaban el receptor P2Y<sub>2</sub> no presentaron un acúmulo significativo del reportero del UPS, lo cual podría indicar que el aumento de expresión del receptor P2Y<sub>2</sub>, por parte de las células astrogiales y microgliales, podría ser un mecanismo celular encaminado a evitar o compensar la alteración de la proteostasis de estas células en un entorno inflamatorio. De esta manera el receptor P2Y<sub>2</sub> parece desempeñar un papel destacado en las primeras fases de respuesta neuroinflamatoria. Finalmente, hay que destacar que el LPS no produjo ningún efecto significativo sobre la proteostasis celular en neuronas. Este hecho puede deberse a que, si bien estas células expresan el receptor TLR4, se ha descrito que el LPS no parece tener un efecto directo sobre este tipo celular (Lehnardt *et al* 2003).

Además de un incremento significativo en el número de células que presentan un acúmulo de la proteína reportera del UPS, la administración de LPS también indujo una disminución significativa en la expresión de la subunidad constitutiva β5 del proteasoma así como un aumento de la subunidad inducible β5i. Este hecho puede indicar que se esté produciendo un reemplazamiento funcional de la subunidad constitutiva β5 por la subunidad inducible β5i, de tal manera que, como esta última es más eficiente en el procesamiento del sustrato (Seifert *et al* 2010), se compense de algún modo la alteración de la proteostasis celular que induce el LPS. Existen otros trabajos en los que la administración de etanol, que al igual que el LPS también activa el receptor

TLR4, induce en el cerebro una gliosis reactiva acompañada de un aumento en la producción y liberación de citoquinas, lo cual desencadena un cuadro de neuroinflamación y neurodegeneración (Alfonso-Loeches *et al* 2012). Utilizando este modelo, Pla y colaboradores describieron que la administración de etanol produce un aumento de las actividades proteolíticas CT-L y T-L en la corteza cerebral, acompañado de una disminución de la expresión de la subunidad  $\beta 5$  y un aumento de las subunidades  $\beta 5i$  y  $\beta 2i$ . Sin embargo, cuando el receptor TLR4 era delecionado, no observaron ninguna modificación en los niveles de expresión de estas subunidades ni en sus correspondientes actividades proteolíticas, lo que indicaba que el receptor TLR4 era clave en la regulación de los procesos anteriormente descritos (Pla *et al* 2014). Sin embargo, en nuestro modelo experimental, en el hipocampo de los ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> tratados con LPS no encontramos variaciones significativas ni en los niveles de expresión de las subunidades  $\beta/\beta i$ , ni en el número de células que presentan un acúmulo de reportero. Estos resultados parecen estar indicando que el receptor P2Y<sub>2</sub> juega un papel clave en la alteración de la proteostasis celular inducida por LPS, sugiriendo que existe una estrecha relación entre los receptores P2Y<sub>2</sub> y TLR4. Fortaleciendo esta hipótesis, los resultados obtenidos en el test comportamental revelaron que, en comparación con los ratones silvestres, los ratones carentes del receptor P2Y<sub>2</sub> muestran una ralentización en el efecto inducido por la administración de LPS y a su vez una recuperación más temprana de las alteraciones comportamentales inducidas por la endotoxina. Estos resultados desvelan que el receptor P2Y<sub>2</sub> es necesario tanto para el desencadenamiento como para el control de la respuesta inflamatoria inducida por LPS. Reforzando la existencia de una estrecha relación entre ambos receptores, se ha descrito que los nucleótidos extracelulares, tanto el ATP como UTP pueden regular negativamente la expresión del receptor TLR4, así como la producción de citoquinas asociadas a la activación de este receptor (Xiao *et al* 2012). De tal manera que el efecto antiinflamatorio atribuido al receptor P2Y<sub>2</sub> también podría deberse a que esté modula negativamente la expresión del receptor TLR4.

Otra posible explicación a los resultados obtenidos en el test comportamental la podemos encontrar en la relación existente entre el receptor P2Y<sub>2</sub> y el receptor de vaniloides TRPV1. El receptor TRPV1 es fundamental para la detección del dolor (Caterina *et al* 2000), y puede ser activado por capsaicina, temperaturas superiores a

43°C o por una acidificación (Caterina *et al* 1997). Además, se ha descrito que la administración de LPS aumenta los efectos inducidos por el receptor TRPV1 teniendo como consecuencia una hiperalgesia (Chung *et al* 2011). Sin embargo, se ha reportado que los ratones carentes del receptor P2Y<sub>2</sub> presentan una función disminuida del receptor TRPV1 (Malin *et al* 2008), lo que deriva en la generación de un cuadro ansiolítico (Kasckow *et al* 2004), así como una menor activación astrogliar y microglial (Marchalant *et al* 2009). Considerando estos trabajos, se podría postular que la mayor interacción social observada en los ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> podría ser debida a que la administración de LPS no indujera una hiperalgesia tipo debido a la funcionalidad deficiente del receptor TRPV1 que presentan los ratones carentes del receptor P2Y<sub>2</sub>.

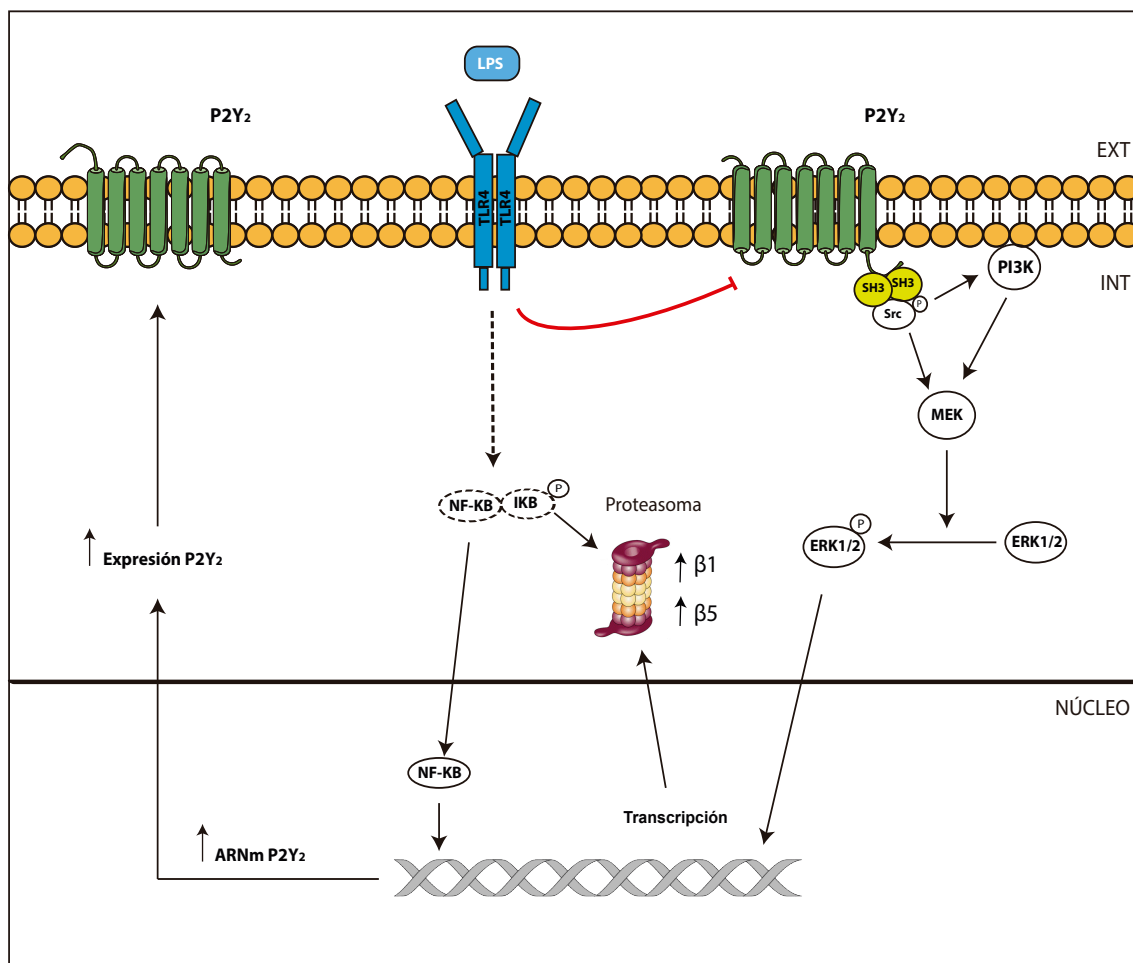
Otro hecho relevante que se observó en los ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> es que, a diferencia de los ratones silvestres, estos no presentan una gliosis reactiva evidente tras la administración de LPS. Una posible justificación a este hecho la podríamos encontrar en que los ratones P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> presentan una migración transendotelial (TEM) deficiente, lo que conllevaría a una menor infiltración de neutrófilos al parénquima cerebral (Inoue *et al* 2008). Además, los ratones carentes del receptor P2Y<sub>2</sub> tampoco poseen el motivo RGD, de tal modo que se vería alterada la normal interacción con las integrinas y otros receptores de factores de crecimiento, limitando así la activación de las GTPasas Rho y Rac, encargadas de promover la migración celular glial y transactivación de receptores de factores de crecimiento así como la proliferación glial asociada a la neuroinflamación (Liao *et al* 2007, Liu *et al* 2004, Weisman *et al* 2005).

La desensibilización de GPCRs es un proceso por el que los receptores se vuelven resistentes o insensibles a la exposición continuada del agonista (Ferguson 2001). Se han identificado dos tipos de desensibilizaciones: (1) desensibilización homóloga, donde el receptor se desensibiliza en respuesta a sus propios agonistas o (2) desensibilización heteróloga debida a una respuesta disminuida del receptor como consecuencia de la activación de otros receptores por sus correspondientes agonistas (Ferguson 2001). Considerando estos hechos, podemos postular que la activación del receptor TLR4 por su agonista LPS podría inducir la desensibilización heteróloga del receptor P2Y<sub>2</sub>. Esta desensibilización podría deberse a una fosforilación en el extremo C-terminal del receptor P2Y<sub>2</sub> que promovería la interacción con las proteínas citosólicas β-arrestinas para su internalización. Así, la alteración en la proteostasis celular inducida por LPS,

sería debida a que la desensibilización de P2Y<sub>2</sub> indujese una disminución de expresión de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 5$ , lo que conllevaría a una disminución de las actividades CT-L y PG-L. De acuerdo con esta hipótesis se observó que el bloqueo farmacológico *in vivo* del receptor P2Y<sub>2</sub> con el antagonista Suramina, induce un aumento del número de células que acumulan el reportero de UPS. Además, se ha descrito que la activación de TLR4 por LPS desencadena una cascada de señalización que implica la activación de NF- $\kappa$ B (Brown *et al* 2011). El factor de transcripción NF- $\kappa$ B normalmente se encuentra secuestrado en el citoplasma a través de la asociación con una proteína inhibidora denominada I $\kappa$ B (Ghosh *et al* 1998). Cuando la célula es expuesta a una señal de activación como es el LPS se produce la fosforilación, ubiquitinación y degradación de I $\kappa$ B, quedando NF- $\kappa$ B libre en el citoplasma, translocándose a núcleo para regular la expresión génica (Gorina *et al* 2011). Es importante recordar que, en nuestro modelo experimental, la administración de LPS en los ratones silvestres indujo un aumento tanto en los niveles de ARNm como en la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub>. De hecho, se ha descrito que bajo estímulo proinflamatorio, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B produce un incremento en la transcripción del receptor P2Y<sub>2</sub> así como la estimulación de COX-2 y PGE<sub>2</sub> (Degagné *et al* 2009). De acuerdo con estos estudios, podríamos postular que el receptor P2Y<sub>2</sub> sintetizado *de novo* ya no se encontraría desensibilizado al no hallarse presente en el espacio extracelular el estímulo proinflamatorio LPS, de tal manera que su activación podría restablecer el equilibrio proteostático alterado por la administración de la endotoxina (Figura 57).

El papel crucial que juega el receptor P2Y<sub>2</sub> en la regulación de la respuesta inmune lo convierte en una atractiva diana farmacológica para el tratamiento de enfermedades que cursan con un componente inflamatorio o enfermedades infecciosas. Inicialmente, se ha sugerido que antagonistas selectivos del receptor P2Y<sub>2</sub> pueden ser una buena herramienta farmacológica para el tratamiento de diferentes enfermedades tales como la arterioesclerosis, la enfermedad obstructiva del pulmón o como terapia contra el cáncer (Rafehi *et al* 2016). Sin embargo, el hecho de que se hayan observado comportamientos antagónicos asociados a la activación de este receptor, tanto en ambientes inflamatorios o en procesos que conlleven daño tisular, comprometen su valor terapéutico. Por un lado se ha descrito que la activación moderada del receptor P2Y<sub>2</sub> protege frente a infecciones bacterianas (Kellerman *et al* 2008), contribuye a la

cicatrización de heridas (Pintor *et al* 2004), potencia la producción de mucina (Burnstock *et al* 2012), y favorece el crecimiento y extensión de neuritas (Peterson *et al* 2013). Pero, por otro lado, también se ha descrito que una sobreactivación del receptor P2Y<sub>2</sub> puede desencadenar una inflamación descontrolada y acabar promoviendo enfermedades inflamatorias crónicas (Ayata *et al* 2012, Inoue *et al* 2008, Lommatzsch *et al* 2010). Este efecto podría deberse a que la activación de P2Y<sub>2</sub> puede desencadenar la activación de la PLA<sub>2</sub> citosólica, la cual promueve la liberación de ácido araquidónico con la consecuente síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (Welch *et al* 2003).



**Figura 57. Esquema representativo de la interacción entre la señalización purinérgica y el Sistema Ubiquitina-Proteasoma bajo condiciones proinflamatorias.** La flecha roja indica la regulación negativa del receptor P2Y<sub>2</sub> por parte del receptor TLR4. La flecha discontinua indica una posible ruta de señalización desencadenada tras la activación del receptor TLR4.

Es importante aclarar que el Up<sub>4</sub>U, comercializado bajo el nombre de Diquafosol, no se encuentra clasificado como un medicamento antiinflamatorio *per se*. Sin embargo, su uso está indicado para el tratamiento tópico del Síndrome de Ojo Seco (Jacobson *et al* 2012), una patología que se caracteriza por presentar cierto componente inflamatorio (Hessen & Akpek 2014). Considerando los resultados que presentamos en esta Tesis Doctoral, se podría postular que este fármaco también pudiera ser eficiente para otras indicaciones terapéuticas. En este sentido, nuestros resultados revelan que el Up<sub>4</sub>U presentaría un efecto antiinflamatorio gracias a su capacidad de devolver a las células gliales el equilibrio proteostático alterado por un cuadro inflamatorio. Como consecuencia de la activación del receptor P2Y<sub>2</sub>, se produciría un incremento en la expresión de la subunidad  $\beta 5$  del proteasoma, lo cual, además de favorecer la recuperación de la proteostasis, evitaría el incremento compensatorio de la expresión de la subunidad  $\beta 5i$ , y por lo tanto la generación y mantenimiento de un ambiente proinflamatorio derivado de la expresión de esa subunidad (Basler *et al* 2013, Muchamuel *et al* 2009, Qureshi *et al* 2012). La importancia que tiene el mantenimiento del equilibrio proteostático celular adecuado se ve reflejado en el hecho en el que inhibidores de las actividades proteolíticas del proteasoma, como es el Bortezomib, se empleen actualmente como terapia en condiciones inflamatorias crónicas (Chen *et al* 2012), en enfermedades neurodegenerativas (Shah & Di Napoli 2007), o bien como agentes anticancerígenos (Liu *et al* 2015).

Como ya hemos mencionado, el UPS no sólo se encarga de la degradación de proteínas intracelulares, si no, que también se encuentra controlando otras funciones como la regulación del ciclo celular (Hochrainer & Lipp 2007). De hecho, se ha descrito que una inhibición prolongada del UPS detiene el ciclo, teniendo como consecuencia la muerte celular (Adams 2004). Por este motivo, algunas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer han sido dirigidas hacia un control de la progresión tumoral mediante el empleo de inhibidores los diferentes componentes que conforman la vía UPS (enzimas E1, E2, E3; DUBs; subunidades proteolíticas del proteasoma) (Liu *et al* 2015). Sin embargo, nuestros estudios realizados en la línea celular N2a mostraron cómo la activación del receptor P2Y<sub>2</sub>, además de revertir el acúmulo de reportero inducido por el inhibidor MG132, también es capaz de evitar la muerte celular inducida por una inhibición prolongada del UPS. En este mismo sentido también hemos

observado que la inhibición de la actividad CT-L, en cultivos primarios de astrocitos, inducida por un inhibidor general del proteasoma como es la Epoxomicina, se ve significativamente reducida por la activación del receptor P2Y<sub>2</sub>. Además, se ha descrito que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> promueve la progresión del ciclo celular, la proliferación de células tumorales (Rafehi *et al* 2016), así como una inhibición de la apoptosis (Arthur *et al* 2006b). Basándonos en estos hechos, se podría plantear el uso combinado de inhibidores del proteasoma y antagonistas del receptor P2Y<sub>2</sub> como posible tratamiento para combatir el cáncer. Esta combinación de fármacos además contrarrestaría la progresión de la metástasis tumoral a través de la apertura de la barrera endotelial atribuida a la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> (Schumacher *et al* 2013).

### 3. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR P2Y<sub>2</sub> EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Aunque inicialmente sería lógico pensar que los procesos neuroinflamatorios son un mecanismo de neuroprotección, cuando estos se mantienen de forma sostenida en el tiempo pueden ejercer un efecto contrario, favoreciendo el desarrollo de procesos patológicos crónicos severos (Akiyama *et al* 2000, Ho *et al* 2005). Se ha postulado que en el cerebro adulto sano existe un equilibrio entre los mediadores pro y antiinflamatorios, lo que conlleva a que la microglía permanezca en un estado “resting” o inactivo. Sin embargo, en cerebros envejecidos este equilibrio se ve comprometido, lo que lleva a la microglía a adoptar un fenotipo reactivo (Perry *et al* 2003). La microglía reactiva es capaz de promover la liberación de citoquinas proinflamatorias (Blasko *et al* 2004), lo cual favorecería la astrogliosis, respuesta caracterizada por un incremento significativo del número de astrocitos que presentan un incremento en los niveles de GFAP y un aumento de su capacidad para secretar citoquinas (Rodriguez-Arellano *et al* 2016).

Como en otras enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad de Alzheimer (E.A) se ha asociado con el mantenimiento prolongado de un estado de neuroinflamación. La E.A es un desorden neurodegenerativo crónico caracterizado por una pérdida progresiva de las funciones cognitivas, siendo el tipo de demencia más prevalente y común en nuestra sociedad. Neuropatológicamente, la E.A se caracteriza



por una acumulación progresiva en el espacio extracelular de placas seniles (constituidas por el péptido A $\beta$  neurotóxico) y ovillos neurofibrilares intracelulares (formados por la acumulación de la proteína tau hiperfosforilada) (Erb *et al* 2015). Es de destacar que en esta enfermedad se produce un aumento en la proliferación y migración glial alrededor de las placas  $\beta$ -amiloide, donde la célula microglial produciría la secreción de citoquinas y factores de crecimiento (Gahtan & Overmier 1999) los cuales podrían a su vez activar receptores presentes en las células gliales, además de promover la muerte neuronal (Mrak & Griffin 2005). Dado que el receptor P2Y<sub>2</sub> se expresa tanto en células microgliales como astrogliales, se ha postulado que puede estar relacionado con la patogénesis de la E.A (Ajit *et al* 2014, Lai *et al* 2008, Leon-Otegui *et al* 2011). De hecho, en muestras de neocórtex de pacientes diagnosticados de la E.A se ha encontrado una reducción significativa de la expresión de este receptor, la cual se correlacionaba con una pérdida de marcadores sinápticos (Lai *et al* 2008). Además, se ha descrito que la delección del receptor P2Y<sub>2</sub> acelera la progresión de la patología en un modelo murino de la E.A, teniendo como consecuencia la muerte prematura de estos ratones (Ajit *et al* 2014). Sin embargo, el mecanismo molecular a través del cual el receptor P2Y<sub>2</sub> puede contribuir a la progresión de la E.A todavía se desconoce. Considerando que se ha postulado que la disfunción del UPS puede ser uno de los principales mecanismos moleculares que subyacen a diferentes enfermedades neurodegenerativas (Gadhav *et al* 2016), sería razonable pensar que una disminución de expresión de P2Y<sub>2</sub> podría contribuir a la disfunción del UPS asociada a la E.A. Con el fin de estudiar esta hipótesis, se generaron los ratones dobles transgénicos J20/U1. Estos ratones además de expresar la proteína reportera del UPS, también expresaban la proteína precursora del amiloide humana (APPh) con las mutaciones Sueca e Indiana, lo cual promueve la generación de las placas amiloidogénicas así como el déficit cognitivo y motor característico de esta enfermedad (Wright *et al* 2013). El análisis del hipocampo de estos ratones reveló que se produce una disminución significativa de la actividad proteolítica del proteasoma, así como una disminución de la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub>, incrementándose ambas deficiencias con la edad. Estos resultados podrían indicar que, según progresa la enfermedad, se produce una pérdida del papel regulador que desempeña el receptor P2Y<sub>2</sub> en el mantenimiento del equilibrio de la proteostasis celular. De esta forma se establece una relación inversamente proporcional entre la



expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> y la progresión de la patología. Esta hipótesis estaría de acuerdo con aquellos estudios en los que se ha descrito que en muestras *postmortem* procedentes de pacientes diagnosticados de la E.A se produce una disminución de la actividad del proteasoma (Keller *et al* 2000, Lopez Salon *et al* 2000, Mishto *et al* 2006), así como una disminución de la expresión del receptor P2Y<sub>2</sub> (Lai *et al* 2008, Ajit *et al* 2014). Sin embargo, estos resultados contrastarían con otros trabajos que han descrito que en pacientes de la E.A se produce un aumento de la expresión de las subunidades inducibles del proteasoma (Mishto *et al* 2006, Orre *et al* 2013). Es importante destacar que, en los ratones Ub<sup>G76V</sup>-GFP/J20, aunque sí observamos una disminución significativa de la subunidad β5 constitutiva, no se produce un aumento significativo de la expresión de la subunidad β5i.

Se ha sugerido que la reducción de la neuroinflamación asociada a la E.A pudiera constituir un tratamiento para combatir dicha patología. De tal manera que diferentes aproximaciones farmacológicas en busca de este efecto tienen cierta efectividad ralentizando o incluso deteniendo la progresión de esta enfermedad inducida en modelos animales (Klegeris *et al* 2007, McGeer & McGeer 2005, Rozemuller *et al* 2005, Weisman *et al* 2012a). Sin embargo, los ensayos clínicos basados en la administración de compuestos antiinflamatorios en pacientes diagnosticados de la E.A no han mostrado resultados concluyentes (Wyss-Coray & Rogers 2012). Otra estrategia terapéutica propuesta consistió en reducir los agregados proteicos característicos de la E.A acelerando su degradación por el UPS. Aunque hay estudios que han demostrado como la sobreexpresión de ciertas enzimas E3 ligasas pueden disminuir eficazmente la cantidad de agregados en células y modelos animales (Lee *et al* 2009), otros grupos se cuestionan el hecho de que el proteasoma pueda o no degradar eficientemente estos agregados (Tsvetkov *et al* 2013, Venkatraman *et al* 2004). Como alternativa a estas aproximaciones, proponemos que la activación selectiva del receptor P2Y<sub>2</sub> mediante la administración del dinucleótido Up<sub>4</sub>U podría tener cierto efecto terapéutico gracias a que en los primeros estadios de la patología podría ayudar a controlar el ambiente neuroinflamatorio asociado a esta enfermedad devolviendo a las células gliales a su equilibrio proteostático. Además, el efecto terapéutico del Up<sub>4</sub>U se vería potenciado por el hecho de que se ha descrito que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> promueve el procesamiento de APP a través de la ruta no-amiloidogénica (Leon-Otegui *et al* 2011), y

también por promover la proliferación celular y la fagocitosis del péptido A $\beta$  (Boucsein *et al* 2003, Kim *et al* 2012, Peterson *et al* 2010). Todos estos hechos refuerzan que la activación del receptor P2Y<sub>2</sub> se podría considerar una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de la E.A.

## CONCLUSIONES

---

1. Los nucleótidos extracelulares, a través de la activación del receptor metabotrópico P2Y<sub>2</sub>, regulan la actividad del UPS tanto *in vitro* como *in vivo*, gracias a que incrementan la expresión de las subunidades constitutivas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 5 del proteasoma a través de la ruta de señalización Src/PI3K/MEK/ERK
2. El efecto neuroprotector asociado a P2Y<sub>2</sub> se debe, en parte, a que es capaz de evitar la citotoxicidad inducida por una inhibición prolongada de la actividad del UPS.
3. El receptor P2Y<sub>2</sub> se encuentra implicado en la respuesta inflamatoria inducida por la administración de LPS, ya que es clave en la alteración de la proteostasis celular inducida por la endotoxina. Además, la activación *in vivo* del receptor P2Y<sub>2</sub> atenúa el desequilibrio que la endotoxina induce sobre la proteostasis celular, probablemente debido a que la activación del receptor TLR4 regule negativamente el receptor P2Y<sub>2</sub>.
4. Dado que durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer se produce una disminución de expresión del receptor P2Y<sub>2</sub>, así como una reducción significativa de la actividad CT-L del proteasoma, postulamos que una activación selectiva del receptor P2Y<sub>2</sub> puede ser una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

## *REFERÊNCIAS*

---

- Abbracchio MP, Brambilla R, Ceruti S, Cattabeni F. 1999. Signalling mechanisms involved in P2Y receptor-mediated reactive astrogliosis. *Progress in brain research* 120: 333-42
- Abbracchio MP, Burnstock G. 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & therapeutics* 64: 445-75
- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, et al. 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews* 58: 281-341
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences* 32: 19-29
- Adams J. 2004. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer cell* 5: 417-21
- Ahmad S, Ahmad A, Ghosh M, Leslie CC, White CW. 2004. Extracellular ATP-mediated signaling for survival in hyperoxia-induced oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 279: 16317-25
- Ajit D, Woods LT, Camden JM, Thebeau CN, El-Sayed FG, et al. 2014. Loss of P2Y(2) nucleotide receptors enhances early pathology in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology* 49: 1031-42
- Akiyama H, Arai T, Kondo H, Tanno E, Haga C, Ikeda K. 2000. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer disease and associated disorders* 14 Suppl 1: S47-53
- Alfonso-Loeches S, Pascual M, Gomez-Pinedo U, Pascual-Lucas M, Renau-Piqueras J, Guerri C. 2012. Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse. *Glia* 60: 948-64
- Ardley HC, Robinson PA. 2005. E3 ubiquitin ligases. *Essays in biochemistry* 41: 15-30
- Arthur DB, Akassoglou K, Insel PA. 2006a. P2Y2 and TrkA receptors interact with Src family kinase for neuronal differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* 347: 678-82
- Arthur DB, Georgi S, Akassoglou K, Insel PA. 2006b. Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 3798-804
- Aschrafi A, Sadtler S, Niculescu C, Rettinger J, Schmalzing G. 2004. Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *Journal of molecular biology* 342: 333-43
- Avila J. 2006. Tau protein, the main component of paired helical filaments. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 9: 171-5
- Ayata CK, Ganai SC, Hockenjos B, Willim K, Vieira RP, et al. 2012. Purinergic P2Y(2) receptors promote neutrophil infiltration and hepatocyte death in mice with acute liver injury. *Gastroenterology* 143: 1620-29 e4

- Ballerini P, Di Iorio P, Caciagli F, Rathbone MP, Jiang S, et al. 2006. P2Y2 receptor up-regulation induced by guanosine or UTP in rat brain cultured astrocytes. *International journal of immunopathology and pharmacology* 19: 293-308
- Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA. 2002. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS letters* 531: 2-6
- Basler M, Kirk CJ, Groettrup M. 2013. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Current opinion in immunology* 25: 74-80
- Basler M, Lauer C, Beck U, Groettrup M. 2009. The proteasome inhibitor bortezomib enhances the susceptibility to viral infection. *Journal of immunology* 183: 6145-50
- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292: 1552-5
- Berti-Mattera LN, Wilkins PL, Madhun Z, Suchovsky D. 1996. P2-purigenic receptors regulate phospholipase C and adenylate cyclase activities in immortalized Schwann cells. *The Biochemical journal* 314 ( Pt 2): 555-61
- Blasko I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P, Grubeck-Loeben B. 2004. How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging cell* 3: 169-76
- Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD. 2002. P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 4814-24
- Bodin P, Burnstock G. 2001. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochemical research* 26: 959-69
- Boucsein C, Zacharias R, Farber K, Pavlovic S, Hanisch UK, Kettenmann H. 2003. Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *The European journal of neuroscience* 17: 2267-76
- Bours MJ, Dagnelie PC, Giuliani AL, Wesselius A, Di Virgilio F. 2011. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Frontiers in bioscience* 3: 1443-56
- Brambilla R, Abbracchio MP. 2001. Modulation of cyclooxygenase-2 and brain reactive astrogliosis by purinergic P2 receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 939: 54-62
- Broussard GJ, Mytar J, Li RC, Klapstein GJ. 2012. The role of inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology* 20: 109-26
- Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M. 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of dental research* 90: 417-27
- Burnstock G. 2007a. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews* 87: 659-797
- Burnstock G. 2007b. Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64: 1471-83

- Burnstock G. 2008. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature reviews. Drug discovery* 7: 575-90
- Burnstock G. 2013. Introduction to purinergic signalling in the brain. *Advances in experimental medicine and biology* 986: 1-12
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *British journal of pharmacology* 40: 668-88
- Burnstock G, Knight GE, Greig AV. 2012. Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *The Journal of investigative dermatology* 132: 526-46
- Carrier L, Schlossarek S, Willis MS, Eschenhagen T. 2010. The ubiquitin-proteasome system and nonsense-mediated mRNA decay in hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovascular research* 85: 330-8
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, et al. 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-13
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-24
- Chai J, Wu Y, Sheng ZZ. 2003. Role of ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle wasting in rats with endotoxemia. *Critical care medicine* 31: 1802-7
- Charlton SJ, Brown CA, Weisman GA, Turner JT, Erb L, Boarder MR. 1996. Cloned and transfected P2Y4 receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP. *British journal of pharmacology* 119: 1301-3
- Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F. 2004. Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *The Journal of biological chemistry* 279: 29628-38
- Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. 1995. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377: 428-31
- Chen FT, Liu YC, Yang CM, Yang CH. 2012. Anti-inflammatory effect of the proteasome inhibitor bortezomib on endotoxin-induced uveitis in rats. *Investigative ophthalmology & visual science* 53: 3682-94
- Cheng Y. 2009. Toward an atomic model of the 26S proteasome. *Current opinion in structural biology* 19: 203-8
- Choi RC, Simon J, Tsim KW, Barnard EA. 2008. Constitutive and agonist-induced dimerizations of the P2Y1 receptor: relationship to internalization and scaffolding. *The Journal of biological chemistry* 283: 11050-63
- Chondrogianni N, Tzavelas C, Pemberton AJ, Nezis IP, Rivett AJ, Gonos ES. 2005. Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *The Journal of biological chemistry* 280: 11840-50



- Chung MK, Lee J, Duraes G, Ro JY. 2011. Lipopolysaccharide-induced pulpitis up-regulates TRPV1 in trigeminal ganglia. *Journal of dental research* 90: 1103-7
- Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS. 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews* 63: 641-83
- Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM. 1997. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry* 272: 31969-73
- Czirr E, Wyss-Coray T. 2012. The immunology of neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation* 122: 1156-63
- D'Ambrosi N, Iafrate M, Saba E, Rosa P, Volonte C. 2007. Comparative analysis of P2Y4 and P2Y6 receptor architecture in native and transfected neuronal systems. *Biochimica et biophysica acta* 1768: 1592-9
- D'Ambrosi N, Iafrate M, Vacca F, Amadio S, Tozzi A, et al. 2006. The P2Y(4) receptor forms homo-oligomeric complexes in several CNS and PNS neuronal cells. *Purinergic signalling* 2: 575-82
- Dahlmann B. 2005. Proteasomes. *Essays in biochemistry* 41: 31-48
- Dantuma NP, Bott LC. 2014. The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Frontiers in molecular neuroscience* 7: 70
- Dantuma NP, Heessen S, Lindsten K, Jellne M, Masucci MG. 2000. Inhibition of proteasomal degradation by the gly-Ala repeat of Epstein-Barr virus is influenced by the length of the repeat and the strength of the degradation signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8381-5
- Dantuma NP, Lindsten K. 2010. Stressing the ubiquitin-proteasome system. *Cardiovascular research* 85: 263-71
- Das S, Bhattacharyya NP. 2014. Transcription regulation of HYPK by Heat Shock Factor 1. *PloS one* 9: e85552
- Degagne E, Grbic DM, Dupuis AA, Lavoie EG, Langlois C, et al. 2009. P2Y2 receptor transcription is increased by NF-kappa B and stimulates cyclooxygenase-2 expression and PGE2 released by intestinal epithelial cells. *Journal of immunology* 183: 4521-9
- Del Puerto A, Wandosell F, Garrido JJ. 2013. Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 7: 197
- DeMartino GN, Slaughter CA. 1999. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 274: 22123-6
- Diaz-Hernandez M, Martin-Aparicio E, Avila J, Hernandez F, Lucas JJ. 2004. Enhanced induction of the immunoproteasome by interferon gamma in neurons expressing mutant Huntingtin. *Neurotoxicity research* 6: 463-8

- Diaz-Hernandez M, Pintor J, Castro E, Miras-Portugal MT. 2001. Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *The European journal of neuroscience* 14: 918-26
- Dinareello CA. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503-8
- Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. 2003. Inactivation of the human P2Y<sub>12</sub> receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 101: 3908-14
- Drury AN, Szent-Gyorgyi A. 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of physiology* 68: 213-37
- Dutta G, Zhang P, Liu B. 2008. The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundamental & clinical pharmacology* 22: 453-64
- Ecke D, Hanck T, Tulapurkar ME, Schafer R, Kassack M, et al. 2008. Hetero-oligomerization of the P2Y<sub>11</sub> receptor with the P2Y<sub>1</sub> receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y<sub>11</sub> receptor. *The Biochemical journal* 409: 107-16
- Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D. 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359: 144-7
- Erb L, Cao C, Ajit D, Weisman GA. 2015. P2Y receptors in Alzheimer's disease. *Biology of the cell* 107: 1-21
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 452: 552-62
- Erb L, Liu J, Ockerhausen J, Kong Q, Garrad RC, et al. 2001. An RGD sequence in the P2Y<sub>2</sub> receptor interacts with alpha(V)beta(3) integrins and is required for G(o)-mediated signal transduction. *The Journal of cell biology* 153: 491-501
- Erb L, Weisman GA. 2012. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley interdisciplinary reviews. Membrane transport and signaling* 1: 789-803
- Eun SY, Seo J, Park SW, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. 2014. LPS potentiates nucleotide-induced inflammatory gene expression in macrophages via the upregulation of P2Y<sub>2</sub> receptor. *International immunopharmacology* 18: 270-6
- Ferguson SS. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* 53: 1-24
- Ferrington DA, Gregerson DS. 2012. Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Progress in molecular biology and translational science* 109: 75-112
- Fields RD, Burnstock G. 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nature reviews. Neuroscience* 7: 423-36
- Figge C, Loers G, Schachner M, Tilling T. 2012. Neurite outgrowth triggered by the cell adhesion molecule L1 requires activation and inactivation of the cytoskeletal protein cofilin.

- Molecular and cellular neurosciences* 49: 196-204
- Gadhav K, Bolshette N, Ahire A, Pardeshi R, Thakur K, et al. 2016. The ubiquitin proteasomal system: a potential target for the management of Alzheimer's disease. *Journal of cellular and molecular medicine* 20: 1392-407
- Gahtan E, Overmier JB. 1999. Inflammatory pathogenesis in Alzheimer's disease: biological mechanisms and cognitive sequeli. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 23: 615-33
- Gandhi S, Wood NW. 2005. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Human molecular genetics* 14 Spec No. 2: 2749-55
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* 16: 225-60
- Gilon T, Chomsky O, Kulka RG. 1998. Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 17: 2759-66
- Giraldez L, Diaz-Hernandez M, Gomez-Villafuertes R, Pintor J, Castro E, Miras-Portugal MT. 2001. Adenosine triphosphate and diadenosine pentaphosphate induce  $[Ca^{2+}]_i$  increase in rat basal ganglia aminergic terminals. *Journal of neuroscience research* 64: 174-82
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140: 918-34
- Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, et al. 2005. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19: 1329-31
- Goding JW, Grobben B, Slegers H. 2003. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica et biophysica acta* 1638: 1-19
- Gomez-Villafuertes R, Pintor J, Gualix J, Miras-Portugal MT. 2003. GABAB receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes. *Neuropharmacology* 44: 311-23
- Gorina R, Font-Nieves M, Marquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM. 2011. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFkappaB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia* 59: 242-55
- Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, et al. 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nature structural biology* 7: 1062-7
- Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, et al. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386: 463-71
- Gualix J, Fideu MD, Pintor J, Rotllan P, Garcia-Carmona F, Miras-Portugal MT. 1997. Characterization of

- diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11: 981-90
- Gualix J, Pintor J, Miras-Portugal MT. 1999. Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *Journal of neurochemistry* 73: 1098-104
- Haglund K, Di Fiore PP, Dikic I. 2003. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends in biochemical sciences* 28: 598-603
- Harden TK, Lazarowski ER, Boucher RC. 1997. Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity. *Trends in pharmacological sciences* 18: 43-6
- Henry CJ, Huang Y, Wynne A, Hanke M, Himler J, et al. 2008. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *Journal of neuroinflammation* 5: 15
- Hernandez F, Diaz-Hernandez M, Avila J, Lucas JJ. 2004. Testing the ubiquitin-proteasome hypothesis of neurodegeneration in vivo. *Trends in neurosciences* 27: 66-9
- Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67: 425-79
- Hessen M, Akpek EK. 2014. Dry eye: an inflammatory ocular disease. *Journal of ophthalmic & vision research* 9: 240-50
- Hicke L, Dunn R. 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual review of cell and developmental biology* 19: 141-72
- Hisamatsu H, Shimbara N, Saito Y, Kristensen P, Hendil KB, et al. 1996. Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *The Journal of experimental medicine* 183: 1807-16
- Ho C, Hicks J, Salter MW. 1995. A novel P2-purinoceptor expressed by a subpopulation of astrocytes from the dorsal spinal cord of the rat. *British journal of pharmacology* 116: 2909-18
- Ho GJ, Dreger R, Hakimian E, Masliah E. 2005. Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. *Current drug targets. Inflammation and allergy* 4: 247-56
- Hobler SC, Williams A, Fischer D, Wang JJ, Sun X, et al. 1999. Activity and expression of the 20S proteasome are increased in skeletal muscle during sepsis. *The American journal of physiology* 277: R434-40
- Hochrainer K, Lipp J. 2007. Ubiquitylation within signaling pathways in- and outside of inflammation. *Thrombosis and haemostasis* 97: 370-7
- Hoffmann C, Moro S, Nicholas RA, Harden TK, Jacobson KA. 1999. The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y1 receptor in surface expression and activation processes. *The Journal of biological chemistry* 274: 14639-47
- Hoffmann C, Ziegler N, Reiner S, Krasel C, Lohse MJ. 2008. Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *The Journal of biological chemistry* 283: 30933-41

- Homolya L, Watt WC, Lazarowski ER, Koller BH, Boucher RC. 1999. Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y(2) receptor (-/-) mice. *The Journal of biological chemistry* 274: 26454-60
- Hu B, Senkler C, Yang A, Soto F, Liang BT. 2002. P2X4 receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP. *The Journal of biological chemistry* 277: 15752-7
- Huber EM, Basler M, Schwab R, Heinemeyer W, Kirk CJ, et al. 2012. Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* 148: 727-38
- Imai Y, Soda M, Takahashi R. 2000. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *The Journal of biological chemistry* 275: 35661-4
- Inoue Y, Chen Y, Hirsh MI, Yip L, Junger WG. 2008. A3 and P2Y2 receptors control the recruitment of neutrophils to the lungs in a mouse model of sepsis. *Shock* 30: 173-7
- Jacobson KA. 2009. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Handbook of experimental pharmacology*: 1-24
- Jacobson KA, Boeynaems JM. 2010. P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug discovery today* 15: 570-8
- Jacobson KA, Balasubramanian R, Deflorian F, Gao ZG. 2012. G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions. *Purinergic signalling* 8: 419-36
- Jahr CE, Jessell TM. 1983. ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature* 304: 730-3
- Jamart C, Gomes AV, Dewey S, Deldicque L, Raymackers JM, Francaux M. 2014. Regulation of ubiquitin-proteasome and autophagy pathways after acute LPS and epoxomicin administration in mice. *BMC musculoskeletal disorders* 15: 166
- Jangula A, Murphy EJ. 2013. Lipopolysaccharide-induced blood brain barrier permeability is enhanced by alpha-synuclein expression. *Neuroscience letters* 551: 23-7
- Kasckow JW, Mulchahey JJ, Geracioti TD, Jr. 2004. Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 28: 291-5
- Kaushik S, Cuervo AM. 2015. Proteostasis and aging. *Nature medicine* 21: 1406-15
- Kawakami A, Nakashima T, Sakai H, Hida A, Urayama S, et al. 1999. Regulation of synovial cell apoptosis by proteasome inhibitor. *Arthritis and rheumatism* 42: 2440-8
- Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. 2000. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 75: 436-9
- Kellerman D, Rossi Mospan A, Engels J, Schaberg A, Gorden J, Smiley L. 2008. Denufosol: a review of studies with inhaled P2Y(2) agonists that led to Phase 3. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 21: 600-7

- Kessler B, Hong X, Petrovic J, Borodovsky A, Dantuma NP, et al. 2003. Pathways accessory to proteasomal proteolysis are less efficient in major histocompatibility complex class I antigen production. *The Journal of biological chemistry* 278: 10013-21
- Khakh BS, Burnstock G. 2009. The double life of ATP. *Scientific American* 301: 84-90, 92
- Kim HJ, Ajit D, Peterson TS, Wang Y, Camden JM, et al. 2012. Nucleotides released from Abeta(1-)(4)(2) -treated microglial cells increase cell migration and Abeta(1-)(4)(2) uptake through P2Y(2) receptor activation. *Journal of neurochemistry* 121: 228-38
- King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G. 2000. Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: 4871-7
- Kirischuk S, Scherer J, Kettenmann H, Verkhratsky A. 1995. Activation of P2-purinoreceptors triggered Ca<sup>2+</sup> release from InsP3-sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes. *The Journal of physiology* 483 ( Pt 1): 41-57
- Kisselev AF, Goldberg AL. 2001. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & biology* 8: 739-58
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, et al. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-8
- Klegeris A, McGeer EG, McGeer PL. 2007. Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease. *Current opinion in neurology* 20: 351-7
- Kloetzel PM. 2001. Antigen processing by the proteasome. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2: 179-87
- Ko H, Carter RL, Cosyn L, Petrelli R, de Castro S, et al. 2008. Synthesis and potency of novel uracil nucleotides and derivatives as P2Y2 and P2Y6 receptor agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16: 6319-32
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96: 635-44
- Kondo S, Kohsaka S, Okabe S. 2011. Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo. *Molecular brain* 4: 27
- Kong Q, Peterson TS, Baker O, Stanley E, Camden J, et al. 2009. Interleukin-1beta enhances nucleotide-induced and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing in rat primary cortical neurons via up-regulation of the P2Y(2) receptor. *Journal of neurochemistry* 109: 1300-10
- Krappmann D, Scheidereit C. 2005. A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. *EMBO reports* 6: 321-6
- Krishtal OA, Marchenko SM, Pidoplichko VI. 1983. Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones. *Neuroscience letters* 35: 41-5



- Kuhlbrodt K, Mouysset J, Hoppe T. 2005. Orchestra for assembly and fate of polyubiquitin chains. *Essays in biochemistry* 41: 1-14
- Kukulski F, Ben Yebdri F, Bahrami F, Fausther M, Tremblay A, Seigny J. 2010. Endothelial P2Y2 receptor regulates LPS-induced neutrophil transendothelial migration in vitro. *Molecular immunology* 47: 991-9
- Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, et al. 2005. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic signalling* 1: 193-204
- Kunapuli SP, Daniel JL. 1998. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *The Biochemical journal* 336 ( Pt 3): 513-23
- Lai MK, Tan MG, Kirvell S, Hobbs C, Lee J, et al. 2008. Selective loss of P2Y2 nucleotide receptor immunoreactivity is associated with Alzheimer's disease neuropathology. *Journal of neural transmission* 115: 1165-72
- Lam YA, Pickart CM, Alban A, Landon M, Jamieson C, et al. 2000. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 9902-6
- Laney JD, Hochstrasser M. 1999. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* 97: 427-30
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. 1992. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48: 405-15
- Lazarowski ER. 2012. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic signalling* 8: 359-73
- Lazarowski ER, Shea DA, Boucher RC, Harden TK. 2003. Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule. *Molecular pharmacology* 63: 1190-7
- Lazarowski ER, Watt WC, Stutts MJ, Boucher RC, Harden TK. 1995. Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *British journal of pharmacology* 116: 1619-27
- Lazarowski ER, Watt WC, Stutts MJ, Brown HA, Boucher RC, Harden TK. 1996. Enzymatic synthesis of UTP gamma S, a potent hydrolysis resistant agonist of P2U-purinoceptors. *British journal of pharmacology* 117: 203-9
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, et al. 1997. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 388: 674-8
- Lee S, Lee DW, Lee Y, Mayer U, Stierhof YD, et al. 2009. Heat shock protein cognate 70-4 and an E3 ubiquitin ligase, CHIP, mediate plastid-destined precursor degradation through the ubiquitin-26S proteasome system in Arabidopsis. *The Plant cell* 21: 3984-4001
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, et al. 2003. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 8514-9

- Leon-Otegui M, Gomez-Villafuertes R, Diaz-Hernandez JI, Diaz-Hernandez M, Miras-Portugal MT, Gualix J. 2011. Opposite effects of P2X7 and P2Y2 nucleotide receptors on alpha-secretase-dependent APP processing in Neuro-2a cells. *FEBS letters* 585: 2255-62
- Leow-Dyke S, Allen C, Denes A, Nilsson O, Maysami S, et al. 2012. Neuronal Toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro. *Journal of neuroinflammation* 9: 230
- Liao Z, Seye CI, Weisman GA, Erb L. 2007. The P2Y2 nucleotide receptor requires interaction with alpha v integrins to access and activate G12. *Journal of cell science* 120: 1654-62
- Lindsten K, Dantuma NP. 2003. Monitoring the ubiquitin/proteasome system in conformational diseases. *Ageing research reviews* 2: 433-49
- Lindsten K, Menendez-Benito V, Masucci MG, Dantuma NP. 2003. A transgenic mouse model of the ubiquitin/proteasome system. *Nature biotechnology* 21: 897-902
- Liu J, Liao Z, Camden J, Griffin KD, Garrad RC, et al. 2004. Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *The Journal of biological chemistry* 279: 8212-8
- Liu J, Shaik S, Dai X, Wu Q, Zhou X, et al. 2015. Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment. *Biochimica et biophysica acta* 1855: 50-60
- Liu Q, Hofmann PA. 2003. Modulation of protein phosphatase 2a by adenosine A1 receptors in cardiomyocytes: role for p38 MAPK. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285: H97-103
- Liu Z, Qin T, Zhou J, Taylor A, Sparrow JR, Shang F. 2014. Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway in RPE alters the expression of inflammation related genes. *Advances in experimental medicine and biology* 801: 237-50
- Lohman AW, Isakson BE. 2014. Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS letters* 588: 1379-88
- Lommatzsch M, Cicko S, Muller T, Lucattelli M, Bratke K, et al. 2010. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 181: 928-34
- Lopez Salon M, Morelli L, Castano EM, Soto EF, Pasquini JM. 2000. Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research* 62: 302-10
- Lustig KD, Erb L, Landis DM, Hicks-Taylor CS, Zhang X, et al. 1992. Mechanisms by which extracellular ATP and UTP stimulate the release of prostacyclin from bovine pulmonary artery endothelial cells. *Biochimica et biophysica acta* 1134: 61-72
- Maksymowych WP, Ikawa T, Yamaguchi A, Ikeda M, McDonald D, et al. 1998. Invasion by *Salmonella typhimurium* induces increased expression of the LMP, MECL, and PA28 proteasome genes and



- changes in the peptide repertoire of HLA-B27. *Infection and immunity* 66: 4624-32
- Malin SA, Davis BM, Koerber HR, Reynolds IJ, Albers KM, Molliver DC. 2008. Thermal nociception and TRPV1 function are attenuated in mice lacking the nucleotide receptor P2Y2. *Pain* 138: 484-96
- Marchalant Y, Brothers HM, Norman GJ, Karelina K, DeVries AC, Wenk GL. 2009. Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis. *Neurobiology of disease* 34: 300-7
- Marchese A, George SR, Kolakowski LF, Jr., Lynch KR, O'Dowd BF. 1999. Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology. *Trends in pharmacological sciences* 20: 370-5
- McGeer EG, McGeer PL. 2005. Abeta immunotherapy and other means to remove amyloid. *Current drug targets. CNS and neurological disorders* 4: 569-73
- McGraw J, Hiebert GW, Steeves JD. 2001. Modulating astrogliosis after neurotrauma. *Journal of neuroscience research* 63: 109-15
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-7
- Millan JL. 2006. Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic signalling* 2: 335-41
- Miras-Portugal MT, Gualix J, Mateo J, Diaz-Hernandez M, Gomez-Villafuertes R, et al. 1999. Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism. *Progress in brain research* 120: 397-409
- Mishto M, Bellavista E, Santoro A, Stolzing A, Ligorio C, et al. 2006a. Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of aging* 27: 54-66
- Mishto M, Santoro A, Bellavista E, Sessions R, Textoris-Taube K, et al. 2006b. A structural model of 20S immunoproteasomes: effect of LMP2 codon 60 polymorphism on expression, activity, intracellular localisation and insight into the regulatory mechanisms. *Biological chemistry* 387: 417-29
- Monsonogo A, Weiner HL. 2003. Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science* 302: 834-8
- Mrak RE, Griffin WS. 2005. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of aging* 26: 349-54
- Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, Suzuki E, Kalim KW, et al. 2009. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nature medicine* 15: 781-7
- Mucke L, Yu GQ, McConlogue L, Rockenstein EM, Abraham CR, Masliah E. 2000. Astroglial expression of human alpha(1)-antichymotrypsin enhances alzheimer-like pathology in amyloid protein precursor

- transgenic mice. *The American journal of pathology* 157: 2003-10
- Muller CE, Thorand M, Qurishi R, Diekmann M, Jacobson KA, et al. 2002. Imidazo[2,1-i]purin-5-ones and related tricyclic water-soluble purine derivatives: potent A(2A)- and A(3)-adenosine receptor antagonists. *Journal of medicinal chemistry* 45: 3440-50
- Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. 2009. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10: 104-15
- Nagaya N, Tittle RK, Saar N, Dellal SS, Hume RI. 2005. An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. *The Journal of biological chemistry* 280: 25982-93
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, et al. 1998. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *The EMBO journal* 17: 3016-28
- Niedermann G, Geier E, Lucchiari-Hartz M, Hitziger N, Ramsperger A, Eichmann K. 1999. The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens. *Immunological reviews* 172: 29-48
- North RA. 1996. Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Current opinion in cell biology* 8: 474-83
- Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF. 1992. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochemical research* 17: 877-85
- Novitskaya T, Chepurko E, Covarrubias R, Novitskiy S, Ryzhov SV, et al. 2016. Extracellular nucleotide regulation and signaling in cardiac fibrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology* 93: 47-56
- Ogata S, Hayashi Y, Takami N, Ikehara Y. 1988. Chemical characterization of the membrane-anchoring domain of human placental alkaline phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 263: 10489-94
- Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP. 2011. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends in neurosciences* 34: 269-81
- Orre M, Kamphuis W, Dooves S, Kooijman L, Chan ET, et al. 2013. Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 136: 1415-31
- Pankratov Y, Castro E, Miras-Portugal MT, Krishtal O. 1998. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 10: 3898-902
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA. 2006. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 452: 589-97
- Pawson T. 1995. Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* 373: 477-8
- Pendergast W, Yerxa BR, Douglass JG, 3rd, Shaver SR, Dougherty RW, et al. 2001. Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5'-polyphosphates. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 11: 157-60

- Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, et al. 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature biotechnology* 21: 921-6
- Perry VH, Newman TA, Cunningham C. 2003. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neuroscience* 4: 103-12
- Peterson TS, Camden JM, Wang Y, Seye CI, Wood WG, et al. 2010. P2Y2 nucleotide receptor-mediated responses in brain cells. *Molecular neurobiology* 41: 356-66
- Peterson TS, Thebeau CN, Ajit D, Camden JM, Woods LT, et al. 2013. Up-regulation and activation of the P2Y(2) nucleotide receptor mediate neurite extension in IL-1beta-treated mouse primary cortical neurons. *Journal of neurochemistry* 125: 885-96
- Pickart CM. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry* 70: 503-33
- Pillois X, Chaulet H, Belloc I, Dupuch F, Desgranges C, Gadeau AP. 2002. Nucleotide receptors involved in UTP-induced rat arterial smooth muscle cell migration. *Circulation research* 90: 678-81
- Pintor J, Bautista A, Carracedo G, Peral A. 2004. UTP and diadenosine tetraphosphate accelerate wound healing in the rabbit cornea. *Ophthalmic & physiological optics : the journal of the British College of Ophthalmic Opticians* 24: 186-93
- Pintor J, Porras A, Mora F, Miras-Portugal MT. 1995. Dopamine receptor blockade inhibits the amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates, diadenosine tetraphosphate and diadenosine pentaphosphate, from neostriatum of the conscious rat. *Journal of neurochemistry* 64: 670-6
- Pintor J, Rotllan P, Torres M, Miras-Portugal MT. 1992. Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Analytical biochemistry* 200: 296-300
- Pla A, Pascual M, Renau-Piqueras J, Guerri C. 2014. TLR4 mediates the impairment of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways induced by ethanol treatment in brain. *Cell death & disease* 5: e1066
- Qureshi N, Morrison DC, Reis J. 2012. Proteasome protease mediated regulation of cytokine induction and inflammation. *Biochimica et biophysica acta* 1823: 2087-93
- Qureshi N, Perera PY, Shen J, Zhang G, Lensch A, et al. 2003. The proteasome as a lipopolysaccharide-binding protein in macrophages: differential effects of proteasome inhibition on lipopolysaccharide-induced signaling events. *Journal of immunology* 171: 1515-25
- Qureshi N, Vogel SN, Van Way C, 3rd, Papasian CJ, Qureshi AA, Morrison DC. 2005. The proteasome: a central regulator of inflammation and macrophage function. *Immunologic research* 31: 243-60
- Rafehi M, Burbiel JC, Attah IY, Abdelrahman A, Muller CE. 2016. Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of the selective

- P2Y<sub>2</sub> receptor antagonist AR-C118925. *Purinergic signalling*
- Rechsteiner M, Hill CP. 2005. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends in cell biology* 15: 27-33
- Reis J, Guan XQ, Kisselev AF, Papasian CJ, Qureshi AA, et al. 2011. LPS-induced formation of immunoproteasomes: TNF- $\alpha$  and nitric oxide production are regulated by altered composition of proteasome-active sites. *Cell biochemistry and biophysics* 60: 77-88
- Ridley AJ. 2001. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in cell biology* 11: 471-7
- Rock KL, Goldberg AL. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annual review of immunology* 17: 739-79
- Rodriguez del Castillo A, Torres M, Delicado EG, Miras-Portugal MT. 1988. Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *Journal of neurochemistry* 51: 1696-703
- Rodriguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A. 2016. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 323: 170-82
- Rosen KM, Moussa CE, Lee HK, Kumar P, Kitada T, et al. 2010. Parkin reverses intracellular beta-amyloid accumulation and its negative effects on proteasome function. *Journal of neuroscience research* 88: 167-78
- Roskoski R, Jr. 2012. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research* 66: 105-43
- Ross CA, Poirier MA. 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine* 10 Suppl: S10-7
- Rozemuller AJ, van Gool WA, Eikelenboom P. 2005. The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Current drug targets. CNS and neurological disorders* 4: 223-33
- Ruddle FH, Shows TB, Roderick TH. 1969. Esterase genetics in *Mus musculus*: expression, linkage, and polymorphism of locus Es-2. *Genetics* 62: 393-9
- Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, Hubbard SL, Becker LE, et al. 1997. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *Journal of neurosurgery* 87: 420-30
- Saganich MJ, Schroeder BE, Galvan V, Bredesen DE, Koo EH, Heinemann SF. 2006. Deficits in synaptic transmission and learning in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice require C-terminal cleavage of APP. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 13428-36
- Salter MW, De Koninck Y, Henry JL. 1993. Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Progress in neurobiology* 41: 125-56
- Samways DS, Li Z, Egan TM. 2014. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Frontiers in cellular neuroscience* 8: 6

- Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, et al. 2008. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 5683-6
- Schmitt HP. 2006. Protein ubiquitination, degradation and the proteasome in neuro-degenerative disorders: no clear evidence for a significant pathogenetic role of proteasome failure in Alzheimer disease and related disorders. *Medical hypotheses* 67: 311-7
- Schumacher D, Strilic B, Sivaraj KK, Wettschureck N, Offermanns S. 2013. Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer cell* 24: 130-7
- Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, et al. 2010. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 142: 613-24
- Seye CI, Kong Q, Erb L, Garrad RC, Krugh B, et al. 2002. Functional P2Y2 nucleotide receptors mediate uridine 5'-triphosphate-induced intimal hyperplasia in collared rabbit carotid arteries. *Circulation* 106: 2720-6
- Seye CI, Yu N, Gonzalez FA, Erb L, Weisman GA. 2004. The P2Y2 nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1). *The Journal of biological chemistry* 279: 35679-86
- Shah IM, Di Napoli M. 2007. The ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibitors in central nervous system diseases. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets* 7: 250-73
- Shang F, Taylor A. 2011. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 51: 5-16
- Shaver SR. 2001. P2Y receptors: biological advances and therapeutic opportunities. *Current opinion in drug discovery & development* 4: 665-70
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ. 2011. beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in pharmacological sciences* 32: 521-33
- Soltoff SP, Avraham H, Avraham S, Cantley LC. 1998. Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 273: 2653-60
- Stefan C, Jansen S, Bollen M. 2005. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends in biochemical sciences* 30: 542-50
- Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, et al. 2001. Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 9983-8
- Takenouchi T, Iwamaru Y, Sugama S, Tsukimoto M, Fujita M, et al. 2011. The activation of P2X7 receptor induces cathepsin D-dependent production of a 20-kDa form of IL-

- 1beta under acidic extracellular pH in LPS-primed microglial cells. *Journal of neurochemistry* 117: 712-23
- Tanaka K, Kasahara M. 1998. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunological reviews* 163: 161-76
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO journal* 19: 94-102
- Tsvetkov AS, Arrasate M, Barmada S, Ando DM, Sharma P, et al. 2013. Proteostasis of polyglutamine varies among neurons and predicts neurodegeneration. *Nature chemical biology* 9: 586-92
- Venkatraman P, Wetzel R, Tanaka M, Nukina N, Goldberg AL. 2004. Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Molecular cell* 14: 95-104
- Verkhraatsky A, Butt A. 2013. Glial Physiology and Pathophysiology.
- Vial C, Roberts JA, Evans RJ. 2004. Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends in pharmacological sciences* 25: 487-93
- Vilchez D, Morante I, Liu Z, Douglas PM, Merkwirth C, et al. 2012. RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature* 489: 263-8
- Vinken M, Decrock E, De Vuyst E, Ponsaerts R, D'Hondt C, et al. 2011. Connexins: sensors and regulators of cell cycling. *Biochimica et biophysica acta* 1815: 13-25
- Vollmayer P, Clair T, Goding JW, Sano K, Servos J, Zimmermann H. 2003. Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *European journal of biochemistry / FEBS* 270: 2971-8
- Volonte C, D'Ambrosi N. 2009. Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *The FEBS journal* 276: 318-29
- von Kugelgen I, Harden TK. 2011. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Advances in pharmacology* 61: 373-415
- Washburn KB, Neary JT. 2006. P2 purinergic receptors signal to STAT3 in astrocytes: Difference in STAT3 responses to P2Y and P2X receptor activation. *Neuroscience* 142: 411-23
- Weisman GA, Ajit D, Garrad R, Peterson TS, Woods LT, et al. 2012a. Neuroprotective roles of the P2Y(2) receptor. *Purinergic signalling* 8: 559-78
- Weisman GA, Camden JM, Peterson TS, Ajit D, Woods LT, Erb L. 2012b. P2 receptors for extracellular nucleotides in the central nervous system: role of P2X7 and P2Y(2) receptor interactions in neuroinflammation. *Molecular neurobiology* 46: 96-113
- Weisman GA, Garrad RC, Erb LJ, Santos-Berrios C, Gonzalez FA. 1999. P2Y receptors in the nervous system: molecular studies of a P2Y2



- receptor subtype from NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Progress in brain research* 120: 33-43
- Weisman GA, Wang M, Kong Q, Chorna NE, Neary JT, et al. 2005. Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Molecular neurobiology* 31: 169-83
- Weisman GA, Woods LT, Erb L, Seye CI. 2012c. P2Y receptors in the mammalian nervous system: pharmacology, ligands and therapeutic potential. *CNS & neurological disorders drug targets* 11: 722-38
- Welch BD, Carlson NG, Shi H, Myatt L, Kishore BK. 2003. P2Y2 receptor-stimulated release of prostaglandin E2 by rat inner medullary collecting duct preparations. *American journal of physiology. Renal physiology* 285: F711-21
- Wright AL, Zinn R, Hohensinn B, Konen LM, Beynon SB, et al. 2013. Neuroinflammation and neuronal loss precede Abeta plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one* 8: e59586
- Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. 2011. NF-kappaB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell research* 21: 146-58
- Wyss-Coray T, Rogers J. 2012. Inflammation in Alzheimer disease- a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2: a006346
- Xiao L, Kim J, Lim M, Dai B, Yang L, et al. 2012. A TLR4 agonist synergizes with dendritic cell-directed lentiviral vectors for inducing antigen-specific immune responses. *Vaccine* 30: 2570-81
- Xu J, Weng YI, Simonyi A, Krugh BW, Liao Z, et al. 2002. Role of PKC and MAPK in cytosolic PLA2 phosphorylation and arachadonic acid release in primary murine astrocytes. *Journal of neurochemistry* 83: 259-70
- Yaar R, Jones MR, Chen JF, Ravid K. 2005. Animal models for the study of adenosine receptor function. *Journal of cellular physiology* 202: 9-20
- Yamada M, Tan CF, Inenaga C, Tsuji S, Takahashi H. 2004. Sharing of polyglutamine localization by the neuronal nucleus and cytoplasm in CAG-repeat diseases. *Neuropathology and applied neurobiology* 30: 665-75
- Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, et al. 2014. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *The Journal of experimental medicine* 211: 1533-49
- Yoshioka K, Nakata H. 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: purinergic receptor complex: generating adenine nucleotide-sensitive adenosine receptors. *Journal of pharmacological sciences* 94: 88-94
- Yu N, Erb L, Shivaji R, Weisman GA, Seye CI. 2008. Binding of the P2Y2 nucleotide receptor to filamin A regulates migration of vascular

smooth muscle cells. *Circulation research* 102: 581-8

Zhang Z, Li X, Xie WJ, Tuo H, Hintermann S, et al. 2012. Anti-parkinsonian effects of Nurr1 activator in ubiquitin-proteasome system impairment induced animal model of Parkinson's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* 11: 768-73

Zimmermann H. 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362: 299-309

Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic signalling* 8: 437-502



*ANEXO*

---



# Regulation of proteasome activity by P2Y<sub>2</sub> receptor underlies the neuroprotective effects of extracellular nucleotides

Laura de Diego-García<sup>a,c</sup>, Mercedes Ramírez-Escudero<sup>a</sup>, Álvaro Sebastián-Serrano<sup>a,c</sup>,  
Juan Ignacio Díaz-Hernández<sup>a,d</sup>, Jesús Pintor<sup>b</sup>, José J. Lucas<sup>d,e</sup>, Miguel Díaz-Hernández<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta de Hierro S/N, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Faculty of Optic and Optometry, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta de Hierro S/N, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

<sup>d</sup> Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBM“SO”), CSIC/UAM, 28049 Madrid, Spain

<sup>e</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 23 June 2016

Received in revised form 22 September 2016

Accepted 16 October 2016

Available online 18 October 2016

### Keywords:

Ubiquitin-proteasome-system

P2Y<sub>2</sub> receptor

Up4U

Neurological disorders

Chymotrypsin-like activity

Postglutamyl-like activity

## ABSTRACT

The Ubiquitin-Proteasome System (UPS) is essential for the regulation of the cellular proteostasis. Indeed, it has been postulated that an UPS dysregulation is the common mechanism that underlies several neurological disorders. Considering that extracellular nucleotides, through their selective P2Y<sub>2</sub> receptor (P2Y<sub>2</sub>R), play a neuroprotective role in various neurological disorders that course with an UPS impairment, we wonder if this neuroprotective capacity resulted from their ability to modulate the UPS. Using a cellular model expressing two different UPS reporters, we found that the stimulation of P2Y<sub>2</sub>R by its selective agonist Up4U induced a significant reduction of UPS reporter levels. This reduction was due to an increase in two of the three peptidase proteasome activities, chymotrypsin and postglutamyl, caused by an increased expression of proteasome constitutive catalytic subunits β1 and β5. The intracellular signaling pathway involved required the activation of IP<sub>3</sub>/MEK1/2/ERK but was independent of PKC or PKA. Interestingly, the P2Y<sub>2</sub>R activation was able to revert both UPS-reporter accumulation and the cell death induced by a prolonged inhibition of UPS. Finally, we also observed that intracerebroventricular administration of Up4U induced a significant increase both of chymotrypsin and postglutamyl activities as well as an increased expression of proteasome subunits β1 and β5 in the hippocampus of wild-type mice, but not in P2Y<sub>2</sub>R KO mice. All these results strongly suggest that the capacity to modulate the UPS activity via P2Y<sub>2</sub>R is the molecular mechanism which is how the nucleotides play a neuroprotective role in neurological disorders.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

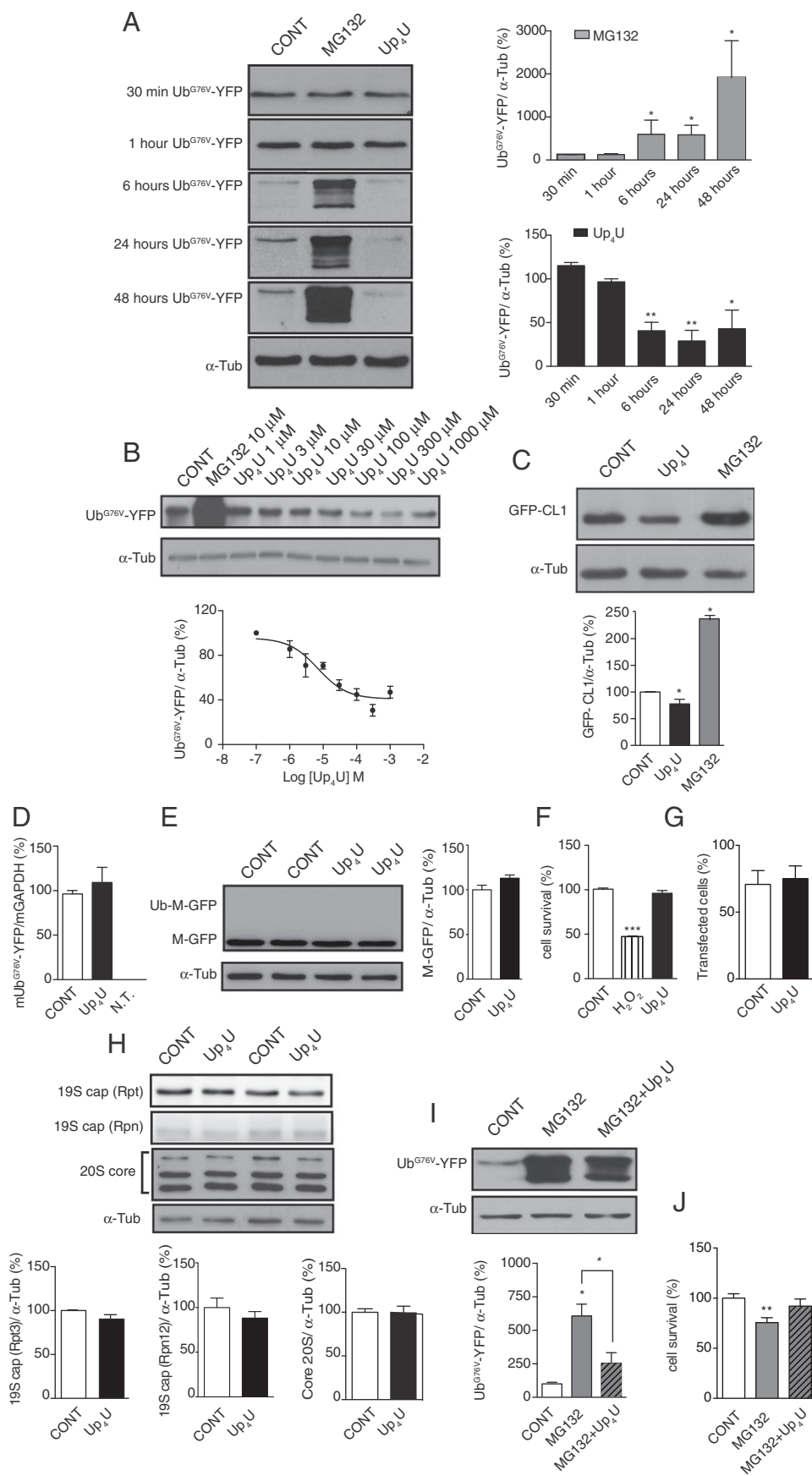
Extracellular nucleotides are released from cells in the central nervous system under a variety of physiological and pathological conditions [1]. These nucleotides can activate specific receptors, denominated P2 receptors, on the surface of neighboring cells [2]. P2 receptors are split into two subtypes, ionotropic receptors (P2XR) and metabotropic receptors (P2YR) [3]. 8 different subunits of P2YR have already been successfully cloned in mammalian (P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>) [4]. All of them are sensitive to adenine nucleotides, but the P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptors can also be activated by uridine nucleotides. P2YR are expressed in the different cellular lineages that shape the brain tissue where they regulate a wide variability of physiological processes, including short-term events that occur in neurotransmission or in secretion, and potent long-term (trophic) roles like cell proliferation and growth or survival to cytotoxic stimuli [5,6].

Since in different cellular and animal models of inflammation or injury was found that metabotropic P2Y<sub>2</sub> receptor was upregulated [7–9],

**Abbreviations:** UPS, Ubiquitin-Proteasome System; P2Y<sub>2</sub>R, P2Y<sub>2</sub> receptor; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trisphosphate; MEK1/2, MAP kinase kinases; ERK, extracellular signal-regulated kinase; PKC, protein kinase C; PKA, protein kinase A; PI3K, inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases; MAPK/ERK, mitogen-activated protein kinases; GFP, green fluorescent protein; YFP, yellow fluorescent protein; ATP, adenosine triphosphate; UTP, uridine triphosphate; PPADS, pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid; Up4U, P1, P4- Di-(uridine-5')- tetraphosphate; N2a, murine neuroblastoma cell line; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; dNTPs, deoxynucleotide mix; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; SDS, sodium dodecyl sulfate; BCA, bicinchoninic acid; UFD, ubiquitin fusion degradation; UbG76 V-YFP, ubiquitin G76V-yellow fluorescent protein; GFP-CL1, C-terminal degradation signal CL1; Ub-M-GFP, protein fusion Ub-GFP; CT-L, chymotrypsin-like activity; PG-L, postglutamyl-like activity; T-L, trypsin-like activity; STS, staurosporine; sAPP, soluble amyloid precursor protein; Src, non-receptor tyrosine kinases; LPS, lipopolysaccharide; PGE2, prostaglandin E2; AD, Alzheimer disease.

\* Corresponding author at: Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta de Hierro S/N, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: [miguel Diaz@ucm.es](mailto:miguel Diaz@ucm.es) (M. Díaz-Hernández).



it was suggested that this receptor can play a key role in the cellular response to tissue damage [10]. Supporting this idea P2Y<sub>2</sub>R activation upregulates anti-apoptotic proteins [11] and promotes cellular survival under hyperoxia-induced oxidative stress conditions [12] or after injury [13]. Neural P2Y<sub>2</sub>R is able to activate several intracellular signaling pathways in brain cells including protein kinase C (PKC) or protein kinase A (PKA) in astrocytes [14], inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases (PI3K) [15] or mitogen-activated protein kinases (MAPK/ERK) in cortical neurons [16]. However, the molecular mechanisms involved in the neuroprotective effect mediated by P2Y<sub>2</sub>R is still unclear [17].

It is widely documented that the amount of misfolded proteins in the cell rapidly increases in different neurodegenerative diseases or pathological processes involving oxidative stress or neuroinflammation environments. Therefore a prompt response to eliminate these breakdown proteins is required to control the cellular proteostasis [18,19]. The UPS contributes to controlling the cellular proteostasis [20], degrading intracellular proteins in the cytoplasm and nucleus of cells through the covalent attaching of multiple ubiquitin molecules to target proteins prior to these are degraded by 26S proteasome complex [21, 22]. The 26S proteasome complex is composed by the 20S catalytic core complex capped at one or both ends by 19S regulatory complex. While the proteolytic activities occur in the 20S catalytic complex, the 19S caps mediate the recognition, deubiquitination, unfolding and translocation of substrate proteins within 20S complex [21–23]. Interestingly, it has been recently reported both in *Caenorhabditis elegans* and in human embryonic stem cells that an elevated proteasome activity, induced by exogenous administration of subunits of 19S proteasome, is sufficient to confer stress resistance and extend the lifespan [24,25]. Considering that in an oxidative stress environment it was also reported that an activation of P2Y<sub>2</sub>R is fundamental for cellular survival [12], in the present work we decided to explore whether the neuroprotective role of extracellular nucleotides is because they are able to modulate the UPS through P2Y<sub>2</sub>R. Using two different GFP-based proteasome substrates, Ub<sup>G76V</sup>-YFP [26] and GFP-CL1 [19], that allow us to monitor the functionality of UPS as well as measure the catalytic activities of proteasome, we found that nucleotides via P2Y<sub>2</sub>R are able to modulate UPS activity, both *in vitro* and *in vivo*.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

All animal procedures were carried out at the Complutense University of Madrid, in compliance with National and European regulations (RD1201/2005; 86/609/CEE) following the guidelines of the International Council for the Laboratory Animal Science.

P2Y<sub>2</sub> deficient mice [27] were provided by Jackson Laboratories, (Bar Harbor, ME, USA). Wild Type and P2Y<sub>2</sub> deficient mice were housed with food and water available *ad libitum* and maintained in a

temperature-controlled environment on a 12/12 h light/dark cycle with light onset at 08:00 A.M.

### 2.2. Cell culture, transfection and treatment conditions

Murine neuroblastoma cell line N2a was plated at  $8 \times 10^5$  cells/well in six-well plates and cultured in DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with Glutamax®, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (all from Gibco). Cells were grown at 37 °C in humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. 24 h after cells plated, when it was required, cells were transiently transfected using Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Transfection efficiency was >70% across all experiments. Plasmid encoding Ub<sup>G76V</sup>-YFP and GFP-CL1 were kindly donated by Prof. Dantuma [28]. Commercial plasmids for overexpression (psP2Y<sub>2</sub>), silencing (shP2Y<sub>2</sub> 1,2,3,4) P2Y<sub>2</sub> were provided by Open Biosystem and Ub-M-YFP was provided by Addgene (Cambridge, MA). As transfection control we used pSLuc plasmid, constructed with the firefly luciferase-targeted oligonucleotide 5-CTGACGCGGAATACTT CGA-3. Synthetic forward and reverse 64-nucleotide oligonucleotides (Sigma-Aldrich) were designed, annealed, and inserted into the BglII/HindIII sites of the pSUPER-neo/GFP vector (OligoEngine, Seattle, WA) following the manufacturer's instructions. These constructions express 19-bp 9-nucleotide stem-loop shRNAs targeted against luciferase (pSLuc shRNA) mRNAs. The concomitant expression of green fluorescent protein (GFP) from this vector allowed the identification of transfected cells by fluorescence microscopy. 24 h after transfection and before cells were stimulated with different drugs for the indicated periods, serum withdrawal to cell cycle arrest. The selective inhibitors for the different kinases and the purinergic receptors antagonists assayed were pre-incubated 20 min before the addition of Up<sub>4</sub>U.

### 2.3. Chemical and antibodies

ATP, UTP, PPADS, MG132 and α-tubulin were purchased from Sigma-Aldrich; LY-294002 and Suramin were supplied from Tocris Bioscience. U0126, U73122 and Staurosporin, were obtained from Merck Millipore. The commercial antibody for P2Y<sub>2</sub> receptor was purchased from Alomone Labs; Antibodies against CORE20S, FK2, Rpt3, Rpn12, β1, β2, β5, β1i, β2i, β5i were obtained from Enzo LifeScience. Anti-phospho-ERK1/2 (E-4) and anti-ERK total (D-2) were supplied from Santa Cruz Biotechnology. Antibody against GFP was obtained from ThermoFisher. Dinucleotide Up<sub>4</sub>U (INS365) was provided by Inspire Pharmaceutical.

### 2.4. Stereotaxic injection

6-Month-old Wild Type and P2Y<sub>2</sub> knockout mice (P2Y<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) were anesthetized with isoflurane (1-chloro-2, 2, 2-trifluoroethyl-

**Fig. 1. Cells expressing Ub<sup>G76V</sup>-YFP or GFP-CL1 decreases the basal accumulation of these UPS-reporters after being stimulated with Up<sub>4</sub>U.** Western blot analysis of N2a cells expressing Ub<sup>G76V</sup>-YFP or GFP-CL1 after being stimulated with the proteasome inhibitor MG132 or with Up<sub>4</sub>U at different concentrations. A. The addition of 100 µM Up<sub>4</sub>U to N2a cells expressing Ub<sup>G76V</sup>-YFP for different stimulation periods (from 30 min to 48 h) reduced the basal levels of Ub<sup>G76V</sup>-YFP while the treatment with the proteasome inhibitor MG132 (10 µM) increased them ( $n = 4$  in triplicate). B. Dose-response curve obtained treating N2a cells expressing Ub<sup>G76V</sup>-YFP for 24 h with Up<sub>4</sub>U at different concentrations ( $n = 3$  in triplicate). C. Stimulation of N2a cells expressing GFP-CL1 with 100 µM Up<sub>4</sub>U for 24 h also reduced the basal levels of UPS reporter ( $n = 3$  in triplicate). D. Analysis of Ub<sup>G76V</sup>-YFP mRNA levels by quantitative RT-PCR in cells treated or not with Up<sub>4</sub>U for 24 h ( $n = 6$  in triplicate). E. Western blot analysis of N2a cells expressing Ub-M-GFP after being stimulated with vehicle solution or 100 µM Up<sub>4</sub>U. The band corresponding to Ub-M-GFP protein was not detected by Western blot and the quantification of GFP protein levels did not show significant differences between both treatments. F and G. Treatment with 100 µM Up<sub>4</sub>U for 24 h did not significantly modify neither the viability of cells (F,  $n = 5$  in triplicate) nor the percentage of transfected cells (G,  $n = 3$  in triplicate). H. Expression levels of the proteasome components 19S and 20S in cells treated or not with 100 µM Up<sub>4</sub>U for 24 h ( $n = 8$  in triplicate). Membranes were probed with anti-α-tubulin antibody to correct any possible deviation on protein loading. I. Accumulation of Ub<sup>G76V</sup>-YFP induced in N2a cells by a 24 h-treatment with 10 µM MG132 ( $n = 12$  in duplicate) significantly decreased when those were treated with 100 µM Up<sub>4</sub>U 20 min after the addition of proteasome inhibitor ( $n = 5$  in triplicate). J. Percentage of cellular survival after to treat N2a cells with 20 µM MG132 for 48 h in presence or absence of 100 µM Up<sub>4</sub>U ( $n = 3$  in duplicate). In all cases, 100% corresponded to the Ub<sup>G76V</sup>-YFP, GFP-CL1 or Ub-M-GFP protein expression detected in cells treated with vehicle solution. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  using an unpaired *t*-test or a ANOVA test by multiple comparison. Data in bar graphs represent mean  $\pm$  s.e.m.

difluoromethylether) (Isovet®, BRAUN) diluted in a 50% O<sub>2</sub>. Mice were kept under anesthesia during the surgery. The scalp was incised along the midline, and one hole was made at the appropriate stereotaxic coordinates from Bregma (mediolateral, 1 mm; anteroposterior, 0.5 mm; dorsoventral, 2.5 mm). Intracerebroventricular (i.c.v.) administration of 2 µl of 45 mM Up<sub>4</sub>U or 2 µl of PBS were infused at a rate of ≈ 1 µl/min. After the injection, the needle was kept for an additional 2 min and then slowly withdrawn. Mice were euthanized 24 h after surgery and hippocampus were micro-dissected for biochemical analysis.

### 2.5. Cell viability assays

After the corresponding treatments, cell viability was tested 24 h or 48 h later by the MTT assay following the manufacturer's instructions (Sigma Aldrich). Values were normalized in respect to that obtained from untreated cells, considered as 100% survival.

### 2.6. RT-PCR and quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from cultured N2a cells using SpeedTools Total RNA extraction Kit (Biotools), following the manufacturer's instructions. After digestion with TURBO DNase (Ambion), total RNA was quantified and reversed transcribed using M-MLV reverse transcriptase, 6 µg of random primers and 350 µM dNTPs (Invitrogen). PCRs were carried out using AmpliTaq Gold® Master Mix (Applied Biosystems), 5 µl of the RT product and specific commercial oligonucleotide primers for Ub-GFP (forward primer, 5'-TGCACCTGGTACTCCGTCT-3'; reverse primer 5'-TCCAGC TCGACCAGGATG-3') and GAPDH (Applied Biosystems). Control reactions were carried out in the absence of RT product (template) to avoid cross contamination. Amplified PCR products were electrophoresed on a 1% agarose gel and visualized by SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen).

Quantitative real-time PCRs were carried out using LuminoCt qPCR readymix (Sigma), 5 µl of the RT product, and gene-specific primers and TaqMan MGB probes for Ub-GFP and GAPDH (Applied Biosystems). Fast thermal cycling was performed using a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) as follows: denaturation, one cycle of 95 °C for 20 s, followed by 40 cycles each of 95 °C for 1 s and 60 °C for 20 s. The results were normalized as indicated by the parallel amplification of the endogenous control GAPDH.

### 2.7. Western blotting

N2a cells were lysed and homogenized for 1 h at 4 °C in lysis buffer containing 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl (all salts from Sigma Aldrich), 1% Nonidet P40 and Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics GmbH), pH 7.4. Hippocampal samples from WT and P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> mice were lysed and homogenized for 20 min at 4 °C in lysis buffer containing 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (all salts from Sigma), 1% Triton X-100, okadaic acid (Calbiochem) and Complete TM Protease Inhibitor Cocktail Tablets, pH 7.4. Separation of proteins was performed on 10 or 12% SDS-PAGE gels. Immunotransference was carried out in nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). The PBS-buffer containing 1% (v/v) Tween-20 and 5% nonfat dried milk or 3% BSA was used as a blocking medium and in subsequent incubations with the antibodies. Incubation with the antibodies was performed at the dilutions specified in parentheses: anti-P2Y<sub>2</sub>R antibody (1:200), anti-GFP (1:1000) antibody, anti-20S CORE (1:1000) antibody, anti-β1 (1:1000) antibody, anti-β2 (1:1000) antibody, anti-β5 (1:1000) antibody, anti-β1i (1:1000) antibody, anti-β2i (1:1000) antibody, anti-β5i (1:1000) antibody, anti-α-tubulin (1:10,000) antibody, anti-p-ERK 1/2 (1:1000) antibody, anti-ERK total (1:1000) antibody and anti-Rpt3 (1:1000) antibody, anti-Rpn12 (1:1000) antibody; anti poly-ubiquitinated proteins (FK2) (1:2000) antibody. Blots were then washed in PBS-T, and incubated for 1 h at room temperature with goat anti-rabbit or goat anti-mouse IgGs coupled to horse-radish

peroxidase (HRP, Amersham GE Healthcare), used at 1:1000 or 1:5000, respectively. Protein bands were visualized by ECL Pro chemiluminescence (Amersham GE Healthcare). Gel band images densities were captured using ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences) and analyzed using ImageJ software (v1.47d, NIH, Bethesda, MD) without applying any background subtraction.

### 2.8. Proteasome activity assays

N2a Cell lysates or hippocampus extracts WT and P2Y<sub>2</sub><sup>-/-</sup> mice were placed on ice and homogenized in extraction buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.5 mM dithiothreitol, 5 mM ATP, 0.03% Triton X-100, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>). The lysates were centrifuged at 13,000 × g at 4 °C for 20 min. The resulting supernatants were placed on ice and assayed for protein concentrations by BCA, Bicinchoninic acid (Bio-Rad). To determine proteasome activity, we followed the procedure previously described [29]. Briefly, extracts were adjusted to 0.5 mg/ml total protein by dilution with extraction buffer. All assays were done in quadruplicate. Chymotrypsin-like activity was determined using the substrate Suc-LLVY-aminomethylcoumarin (AMC) (Sigma; 100 µM), trypsin-like activity was determined using the substrate Boc-LSTR-AMC (Sigma; 100 µM), and postglutamyl-like activity was determined using the substrate Z-LLE-β-2-naphthylamine (NAP) (Sigma; 200 µM). Assay mixtures containing 6 µg of protein, substrate and assay buffer (100 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM EGTA) which are made up in a final volume of 150 µl. For kinetic studies, incubations were performed at 37 °C for 60 min. The cleavage products AMC and NAP were analyzed, after stopping the reaction with 1 ml of 1% SDS, in a fluorimeter (excitation/emission: 333/410 nm for NAP and 380/435 nm for AMC). Background activity (caused by non-proteasomal degradation) was determined by addition of the proteasome inhibitor MG132 at a final concentration of 10 µM.

### 2.9. Statistical analysis

Results were analyzed by unpaired *t*-test or ANOVA test using GRAPH PAD PRISM 6 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) and expressed as the mean ± standard error of the mean. Differences were considered to be significant at *p* ≤ 0.05.

## 3. Results

### 3.1. The selective P2Y<sub>2</sub>R agonist Up<sub>4</sub>U increases the UPS activity in N2a cells

To investigate whether the P2Y<sub>2</sub>R activation regulates UPS activity, we used two different GFP-based proteasome substrates, the ubiquitin fusion degradation (UFD) substrate ubiquitin<sup>G76V</sup>-yellow fluorescent protein (Ub<sup>G76V</sup>-YFP) [26] and the GFP protein fused with the C-terminal degradation signal CL1 (GFP-CL1) [19]. Although initially these reporters were designed to detect an UPS impairment, different works have notified that both are also able to sense increases on UPS activity [24]. Transfected N2a cells with Ub<sup>G76V</sup>-YFP were treated with the selective P2Y<sub>2</sub>R agonist 100 µM Up<sub>4</sub>U [30–32] or with the reversible proteasome inhibitor 10 µM MG132 at different times (30 min, 1 h, 6 h, 24 h and 48 h) (Fig. 1A). Results showed that only long stimulations (for 6, 24 or 48 h) with Up<sub>4</sub>U or MG132 induced significant modification in the levels of Ub<sup>G76V</sup>-YFP. However, the effects induced by Up<sub>4</sub>U or MG132 were opposites. While MG132 caused a significant accumulation of the UPS reporter, Up<sub>4</sub>U produced a significant decrease of this protein (Fig. 1A and supplementary Fig. 1) in a dose-dependent way and showing a pEC<sub>50</sub> value of −5.15 ± 0.46 M (Fig. 1B). Similar results were obtained in N2a cells transfected with GFP-CL1 (Fig. 1C). According with these results, a reduction in poly-ubiquitinated proteins was observed in cells treated with Up<sub>4</sub>U (Supplementary Fig. 1).

To elucidate if the reduction in UPS reporter levels was due to alterations in its transcription mechanism, we decided to measure the levels



of Ub<sup>G76V</sup>-YFP mRNA in transfected N2a cells treated or not with Up<sub>4</sub>U by quantitative PCR. Nevertheless, we did not detect any significant differences between either groups (Fig. 1D). Moreover, the possible alterations that Up<sub>4</sub>U might induce at protein translation level were also evaluated using the protein fusion Ub-M-GFP [26], a fusion protein that lacks the G76 V substitution so that is rapidly cleaved to release the ubiquitin moiety and GFP. Results obtained revealed that cells treated with Up<sub>4</sub>U showed similar levels of GFP than those treated with vehicle solution (Fig. 1E). In addition, we detected neither a significant cell death (Fig. 1F) nor reduction in the proportion of transfected cells (Fig. 1G) when cells were stimulated with Up<sub>4</sub>U. In view of these results, we reasoned that the reduction in UPS-reporters may be due to a modification in the cellular content of proteasomes. To test this possibility, we performed Western blot analysis with different anti-proteasome antibodies, antibodies against native 20S proteasome or antibodies against 19S ATPase or non-ATPase subunits. However, the results obtained did not reveal any differences in proteasome content between cells treated with Up<sub>4</sub>U or with vehicle (Fig. 1H).

Interestingly, both the accumulation of Ub<sup>G76V</sup>-YFP protein (Fig. 1I) and the cell death induced by MG132 (Fig. 1J) were significantly reduced when cells were co-treated with Up<sub>4</sub>U.

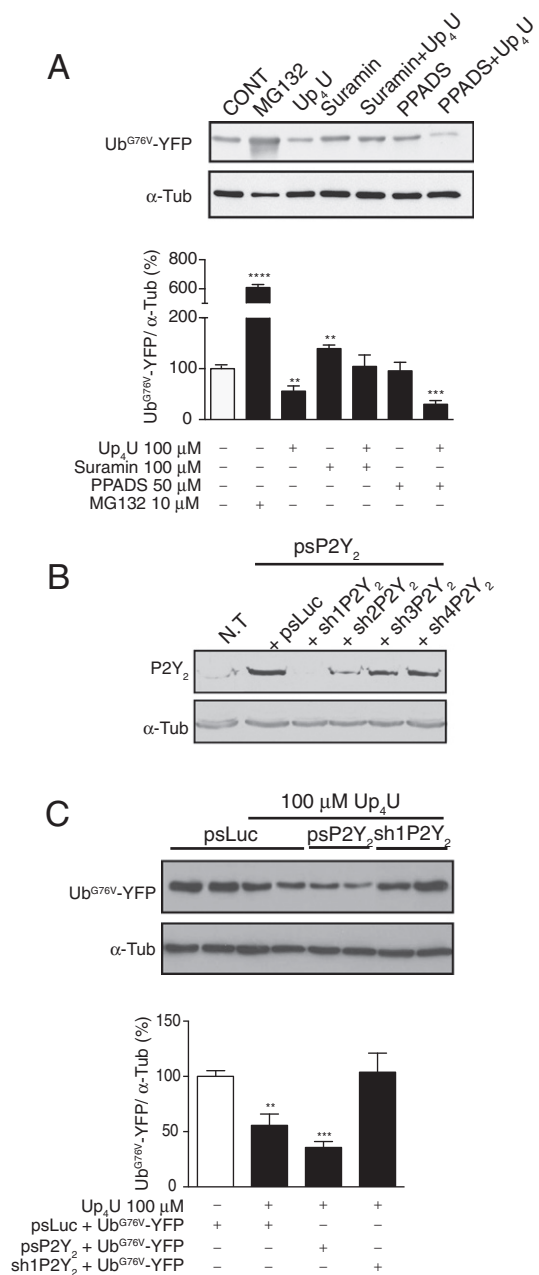
### 3.2. Up<sub>4</sub>U modulates the UPS via P2Y<sub>2</sub>R

To prove that effects mediated by Up<sub>4</sub>U were induced by P2Y<sub>2</sub>R activation, we performed an initial pharmacological approach using two different antagonists against P2Y receptors sensitive to uridine nucleotides, PPADS (antagonist of P2Y<sub>4</sub>R and P2Y<sub>6</sub>R) and Suramin (antagonist of P2Y<sub>2</sub>R) [4]. As shown in Fig. 2A, the drop of Ub<sup>G76V</sup>-YFP levels induced by 100 μM Up<sub>4</sub>U was reverted by 100 μM Suramin, but not for 50 μM PPADS. Using molecular biology tools that allowed us to overexpress or downregulate selectively the P2Y<sub>2</sub>R (Fig. 2B), we could confirm the involvement of P2Y<sub>2</sub>R in the effect induced by Up<sub>4</sub>U. We noticed that the reduction on Ub<sup>G76V</sup>-YFP levels induced by Up<sub>4</sub>U was higher in cells overexpressing P2Y<sub>2</sub>R than those expressing normal levels of this receptor (Fig. 2C). In addition, we also observed that downregulation of P2Y<sub>2</sub>R by selective shRNAs reverted the reduction on Ub<sup>G76V</sup>-YFP levels produced by Up<sub>4</sub>U (Fig. 2C).

### 3.3. P2Y<sub>2</sub>R regulates UPS by increasing the chymotrypsin and postglutamyl proteasome activities

To explore the mechanisms involved in the modulation of UPS mediated by P2Y<sub>2</sub>R, we decided to analyze the 26S proteasome catalytic activities in N2a cells after they were stimulated or not with 100 μM Up<sub>4</sub>U. As shown in Fig. 3A, stimulation of N2a cells with 100 μM Up<sub>4</sub>U significantly raised both the chymotrypsin-like (CT-L) and postglutamyl-like (PG-L) peptidase activities (Fig. 3A and E), but not modified the trypsin-like activity (T-L) (Fig. 3I). In agreement with these results, the kinetic analysis of CT-L and PG-L activities revealed that Up<sub>4</sub>U stimulation induced a significant increase of V<sub>max</sub> values in both activities (38.5 ± 14% for CT-L and 51.79 ± 45% for PG-L compared with control) but did not modify their K<sub>m</sub> values (the K<sub>m</sub> values for CT-L activity were 144.3 ± 37.16 μM for vehicle treated cells and 111.4 ± 33.36 μM for Up<sub>4</sub>U treated cells, while for PG-L activity were 476.3 ± 178 μM for vehicle treated cells and 594 ± 262.8 μM for Up<sub>4</sub>U treated cells) (Fig. 3B and F). When we analyzed the T-L activity, no significant differences in V<sub>max</sub> or K<sub>m</sub> values between cells treated with vehicle or Up<sub>4</sub>U were detected (Fig. 3J).

Taking into account that P2Y<sub>2</sub>R activation did not alter the cellular content of proteasomes, we reasoned that the increase in CT-L and PG-L could be due to an increase in the amount of constitutive catalytic subunits that conforms proteasomes or its replacement by other more active catalytic subunits like the inducible subunits [33,34]. To test this possibility, we performed Western blot analysis with antibodies against the different catalytic subunits of the proteasome. The results obtained



**Fig. 2.** The reduction on Ub<sup>G76V</sup>-YFP levels induced by Up<sub>4</sub>U is mediated by P2Y<sub>2</sub> receptor activation. **A**, Western blot analysis of N2a cells expressing Ub<sup>G76V</sup>-YFP stimulated with Up<sub>4</sub>U in presence or absence of different P2Y antagonists. Suramin but not PPADS avoided the reduction in Ub<sup>G76V</sup>-YFP levels induced by 100 μM Up<sub>4</sub>U ( $n = 4$  in triplicate). **B**, expression levels of P2Y<sub>2</sub> receptor in N2a cells co-transfected with plasmids overexpressing P2Y<sub>2</sub>R plus different shRNA candidates against P2Y<sub>2</sub>R ( $n = 3$  in triplicate). **C**, Overexpression of P2Y<sub>2</sub> receptor accentuated the reduction of Ub<sup>G76V</sup>-YFP levels induced by Up<sub>4</sub>U while a selected shRNA against this receptor reverted this reduction ( $n = 3$  in triplicate). Membranes were normalized with anti- $\alpha$ -tubulin antibody. 100% corresponded to the Ub<sup>G76V</sup>-YFP protein expression detected in cells treated with vehicle solution (A) or in those cells co-transfected with Ub<sup>G76V</sup>-YFP and psLuc (C). \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  using an unpaired  $t$ -test. Data in bar graphs represent mean  $\pm$  s.e.m.

revealed that after being stimulated with Up<sub>4</sub>U, cells increased the expression of constitutive catalytic subunits  $\beta$ 1 and  $\beta$ 5 but not the inducible subunits  $\beta$ 5i or  $\beta$ 1i (Fig. 3C-D and G-H). In accordance with the absence of alterations on T-L activity, we did not detect any significant modification in  $\beta$ 2 or  $\beta$ 2i subunits levels in those cells stimulated with

Up<sub>4</sub>U (Fig. 3K–L). Altogether, these results suggest that activation of P2Y<sub>2</sub>R increases the UPS activity by increasing the expression of proteasome  $\beta$ 1 and  $\beta$ 5 subunits.

### 3.4. MEK1/2 and PI3 kinases are involved in the modulatory effect that P2Y<sub>2</sub>R exerts on UPS

In the next step, we set out to identify the intracellular signaling pathway by which P2Y<sub>2</sub>R was able to modulate the proteasome activity. To spot the intracellular signal transduction pathways triggered by the P2Y<sub>2</sub>R activation, we used a broad battery of selective inhibitors of the main intracellular enzymes that have been associated to this receptor. In different cellular and animal models the activation of P2Y<sub>2</sub>R has been associated with the activation of PKC or PKA [14]. However, the pretreatment of N2a cells overexpressing Ub<sup>G76V</sup>-YFP with a selective inhibitor of PKC (50 nM GF1) or PKA (1  $\mu$ M H89), did not modify either the basal levels of UPS reporter or its reduction induced by Up<sub>4</sub>U (Fig. 4A). Similar results were obtained with other PKC inhibitor staurosporine (STS) or with the selective inhibitor of the upstream enzyme phospholipase C (PLC) U73122 (data not shown). Nevertheless, when cells were pre-treated with selective inhibitors of PI3K, 50  $\mu$ M LY294002, or MAP kinase kinases (MEK1/2), 50  $\mu$ M U0126, we detected a significant increase in the basal Ub<sup>G76V</sup>-YFP levels (Fig. 4B). In addition, the pretreatment of cells with LY294002 or U0126 also prevented the reduction of UPS reporter induced by Up<sub>4</sub>U (Fig. 4B). Supporting the involvement of MEK1/2 in the effect mediated by P2Y<sub>2</sub>R we detected

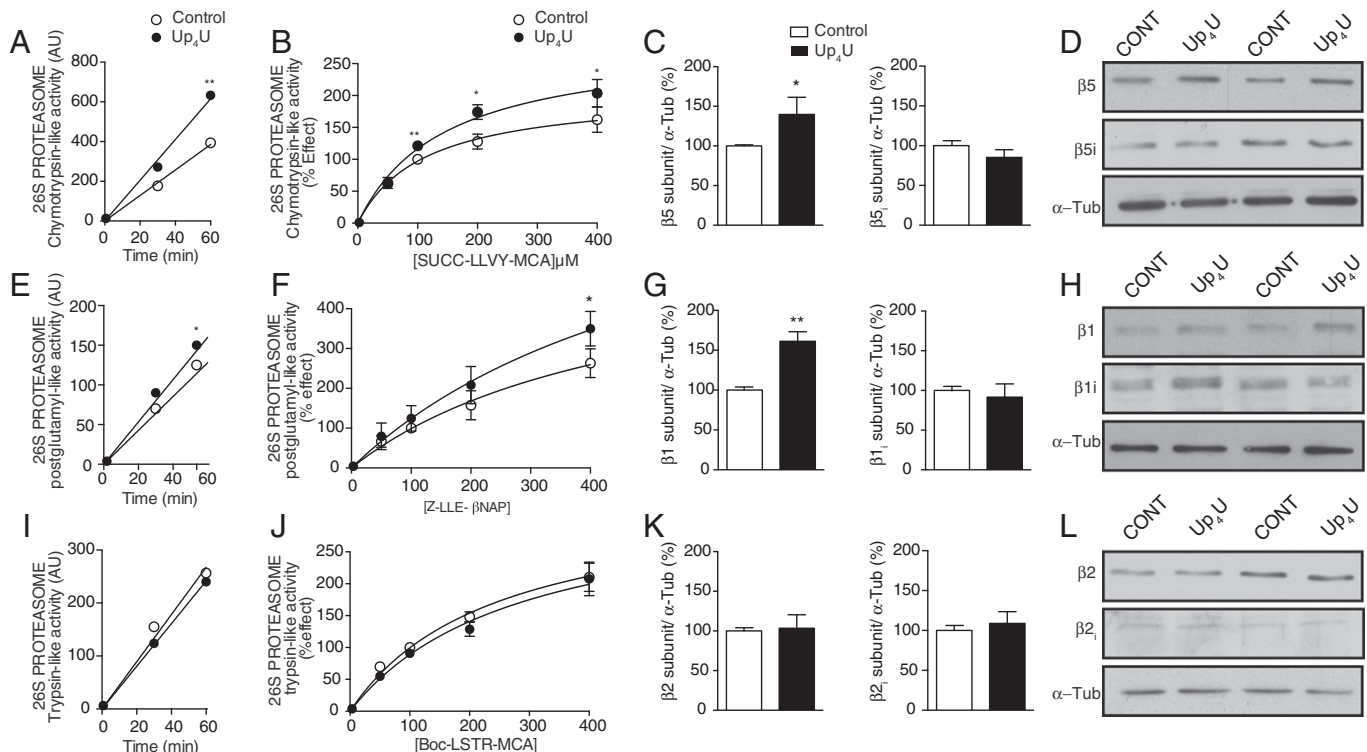
that stimulation of cells with Up<sub>4</sub>U induced a significant increase in the phosphorylation levels of ERK1 and ERK2 (Fig. 4C).

### 3.5. In vivo administration of selective P2Y<sub>2</sub>R agonist Up<sub>4</sub>U regulates UPS activity

Finally, we decided to check *in vivo* if the activation of P2Y<sub>2</sub>R modulated the UPS activity in brain cells. In these studies, we administrated Up<sub>4</sub>U or vehicle solution by stereotaxic intracerebroventricular injection (i.c.v) both to wild type mice (WT) and P2Y<sub>2</sub>R knockout mice (P2Y<sub>2</sub>R<sup>−/−</sup>). 24 h after injection, the animals were sacrificed and the hippocampus was isolated to measure CT-L and PG-L activities and quantify the catalytic  $\beta$  subunits expression. In accordance with the results obtained in N2a cells, the treatment with Up<sub>4</sub>U induced in WT mice a significant increase in the expression levels of proteasome  $\beta$ 5 and  $\beta$ 1 subunits (Fig. 5A and B) that resulted in a significant increase in CT-L and PG-L activities in WT mice (Fig. 5C and D). However, in P2Y<sub>2</sub>R<sup>−/−</sup> mice, the administration of Up<sub>4</sub>U did not induce any significant change either in proteasome CT-L and PG-L activities or levels of proteasome subunits  $\beta$ 5 or  $\beta$ 1 (Fig. 5 A–D).

## 4. Discussion

In the present work, using both *in vitro* and *in vivo* approaches, we demonstrate for the first time, that extracellular purines via P2Y<sub>2</sub>R regulate the UPS activity in central nervous system cells. It was, therefore, discovered that cells expressing UPS reporters Ub<sup>G76V</sup>-YFP or GFP-CL1



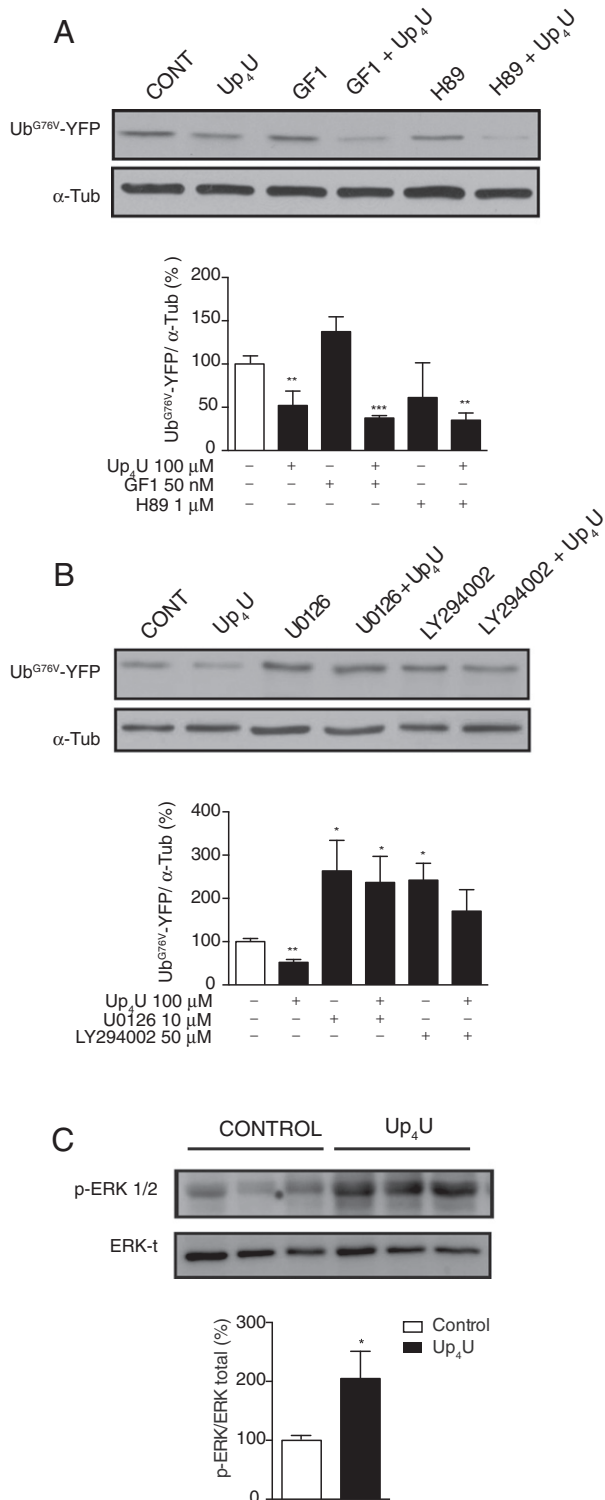
**Fig. 3. Activation of P2Y<sub>2</sub>R by Up<sub>4</sub>U stimulates the 26S proteasome chymotrypsin-like (CT-L) and postglutamyl-like (PG-L) activities increasing the expression of constitutive  $\beta$ 5 and  $\beta$ 1 proteasome subunits.** Measurement of 26S proteasome peptidase activities in N2a cells after being treated for 24 h with 100  $\mu$ M Up<sub>4</sub>U (solid circles) or vehicle (open circles). Time course of 26S proteasome CT-L (A), 26S proteasome PG-L (E) and 26S proteasome trypsin-like (T-L) (I) activities. Michaelis-Menten representations of 26S proteasome CT-L (B), 26S proteasome PG-L (F) and 26S proteasome T-L (J) activities. In all reactions, the specificity of the fluorogenic reaction was verified by addition of the MG132 proteasome inhibitor. Values are represented at least the mean  $\pm$  s.e.m. of five independent experiments run in quadruplicate. Western blot analysis of the expression of constitutive and inducible proteolytic proteasome subunits in N2a cells after being stimulated with Up<sub>4</sub>U or vehicle solution. C and D, P2Y<sub>2</sub>R activation by 100  $\mu$ M Up<sub>4</sub>U increases the expression levels of constitutive  $\beta$ 5 ( $n = 9$  in triplicate) but not inducible  $\beta$ 5i ( $n = 11$  in triplicate) subunits. G and H, Stimulation of N2a cells with 100  $\mu$ M Up<sub>4</sub>U induced an increase in expression levels of constitutive  $\beta$ 1 ( $n = 4$  in triplicate) but not inducible  $\beta$ 1i subunits ( $n = 6$  in triplicate). K and L, 100  $\mu$ M Up<sub>4</sub>U stimulation did not modify the expression levels neither constitutive  $\beta$ 2 ( $n = 4$  in triplicate) subunit nor inducible  $\beta$ 2i subunit ( $n = 8$  in triplicate). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  using an unpaired *t*-test. Data in bar graphs represent mean  $\pm$  s.e.m.

decreased their basal levels after being stimulated with Up<sub>4</sub>U at a similar concentration range to the peak concentration estimated that nucleotides may reach in synaptic cleft under physiological conditions [35]. The involvement of P2Y<sub>2</sub>R in this phenomenon was confirmed using pharmacological and molecular biology tools, including the selective knockdown of receptor by specific shRNA. We also found that the reduction of UPS reporter levels was caused by an increase in CT-L and PG-L proteasome peptidases activities produced by an enhanced

expression of catalytic proteasome subunits  $\beta 1$  and  $\beta 5$  induced by P2Y<sub>2</sub> activation. Our studies also revealed that the intracellular signaling pathway underlying this phenomenon involves the PI3K and ERK1/2 activation but does not require the PKC or PKA activation. Some groups have reported that intracellular signaling pathway associated to neural P2Y<sub>2</sub>R requires the involvement of PKC or PKA, as demonstrated by the sAPP $\alpha$  release induced by P2Y<sub>2</sub>R in cortical neurons [15]. However, others studies have discarded the involvement of these kinases in the signaling associated to neural P2Y<sub>2</sub>R [36]. This versatility of the signaling pathway associated to P2Y<sub>2</sub>R is mainly due to the fact that besides the “classical” components of P2Y<sub>2</sub> G-proteins signal transduction (i.e. Ca<sup>2+</sup> and PKC or PKA), this receptor also contains two Src-homology-3 (SH3) binding domains in the intracellular C-terminus [37]. Considering that Src activation by P2Y<sub>2</sub>R can lead to the activation of PI3K and ERK1/2 [17, 36], and that ERK1/2 catalyzes the phosphorylation of hundreds of nuclear substrates including regulatory molecules and transcription factors [38], we can postulate that the increase expression of  $\beta 1$  and  $\beta 5$  proteasome subunits induced by P2Y<sub>2</sub>R activation involves Src/PI3K/MEK/ERK. However, to confirm this hypothesis additional experiments are required. In concordance with the results obtained in our cellular model, *in vivo* administration of Up<sub>4</sub>U induced in WT mice an increase of CT-L and PG-L proteasome activities linked with an increased expression of catalytic proteasome subunits  $\beta 1$  and  $\beta 5$ . The involvement of P2Y<sub>2</sub>R was definitely confirmed by the lack of any significant modification either in proteasome peptidase activities or in the levels of proteasome catalytic subunits in the hippocampus of P2Y<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice treated with Up<sub>4</sub>U.

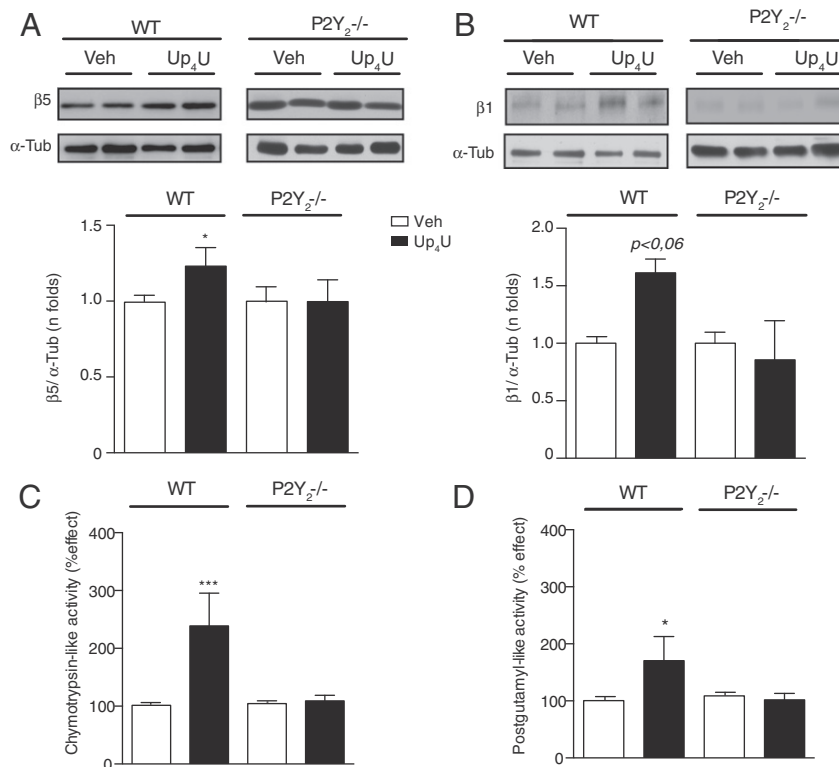
The neuroprotective role associated to P2Y<sub>2</sub>R has been mainly observed under pathological conditions like neuroinflammation, oxidative stress and neurodegenerative diseases [17] where an UPS impairment [39] also takes place. In an oxidative stress condition, a proper response of UPS is essential to control the cellular proteostasis and to promote the cellular survival [19,21,28]. Indeed, it was recently reported that an enhanced expression of 19S proteasome subunits provides an oxidative stress resistance and extends the life span [24]. Considering that it has been suggested that an activation of P2Y<sub>2</sub>R is also vital for the cellular survival in oxidative conditions [12], it is reasonable to conceive that the regulation of UPS via P2Y<sub>2</sub>R may be the underlying molecular mechanism for neuroprotection. However, in our experimental cellular model we did not detect significant changes in the levels of any 19S proteasome subunits analyzed. Nevertheless, we found that P2Y<sub>2</sub>R activation increases two of the three proteasome proteolytic activities, CT-L and PG-L, by upregulating the expression of catalytic proteasome subunits  $\beta 1$  and  $\beta 5$ . In accordance with our results, other authors have described that overexpression of  $\beta 5$  enhances the survival of cells treated with various oxidant stimuli [40].

It is well documented that P2Y<sub>2</sub>R also plays an important role in the neuro-inflammation. Indeed, the inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) increases the expression of P2Y<sub>2</sub>R in macrophage cells, and its activation results in PGE<sub>2</sub> secretion [41]. Furthermore, the activation of P2Y<sub>2</sub>R in endothelial cells potentiates the trans-endothelial migration of monocytes cells induced by LPS, a key process to increase



**Fig. 4. PI3K and ERK1/2 kinases are involved in the stimulation of 26S proteasome activity induced by P2Y<sub>2</sub> receptor activation.** Western blot analysis of N2a cells expressing Ub<sup>G76V</sup>-YFP stimulated with 100  $\mu$ M Up<sub>4</sub>U and pre-treated with selective inhibitors of intracellular kinases. A, both selective inhibitor of PKA 1  $\mu$ M H89 (n = 3 in triplicate) or PKC selective inhibitor 50 nM GF1 (n = 3 in triplicate) did not revert the reduction on Ub<sup>G76V</sup>-YFP levels induced by 100  $\mu$ M Up<sub>4</sub>U. B, Pretreatment of cells both with the selective inhibitor of PI3K 50  $\mu$ M LY294002 (n = 5 in triplicate) and selective inhibitor of MEK 50  $\mu$ M U0126 (n = 3 in triplicate) avoided the reduction on Ub<sup>G76V</sup>-YFP levels induced by 100  $\mu$ M Up<sub>4</sub>U and induced a significant increase in basal levels of Ub<sup>G76V</sup>-YFP. C, Cells treated with 100  $\mu$ M Up<sub>4</sub>U showed an increased phosphorylation levels of ERK1/2 (n = 3 in triplicate). Membranes were normalized with anti- $\alpha$ -tubulin or with anti-total ERK antibodies. 100% corresponded to the Ub<sup>G76V</sup>-YFP protein expression detected in cells treated with vehicle solution. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 using an unpaired t-test. Data in bar graphs represent mean  $\pm$  s.e.m.





**Fig. 5.** *In vivo* administration of Up<sub>4</sub>U stimulates the 26S proteasome activity by increasing the β5 and β1 proteasome subunits expression. Western blot analysis of the expression of β5 (A) and β1 (B) proteasome subunits in hippocampal extracts from WT mice (n = 5 in triplicate for β5 and β1) and P2Y<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> mice (n = 3 in triplicate for β5 and β1) after i.c.v. injection of Up<sub>4</sub>U (solid bars) or Vehicle (open bars). Membranes were normalized with anti-α-tubulin. 100% corresponded to β5 (A) or β1 (B) protein expression detected in WT mice treated with vehicle solution. Measurement of chymotrypsin-like (C) and postglutamyl (D) peptidases activities assayed in hippocampal extracts from wild type mice (WT) and P2Y<sub>2</sub> receptor knockout mice (P2Y<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) after i.c.v. injection of Up<sub>4</sub>U (solid bars) or vehicle solution (Veh) (open bars). Proteasome activity is normalized by assaying the same amount of hippocampal tissue (6 μg) in each sample. 100% value correspond to activity detected in WT mice treated with vehicle solution. In all reactions, the specificity of the fluorogenic reaction was verified by addition of the MG132 proteasome inhibitor. Values are represented, at least, the mean ± s.e.m. of four independent experiments run in quadruplicate, \*p < 0.05 and \*\*\*p < 0.001 using an unpaired t-test. Data in bar graphs represent mean ± s.e.m.

the resident microglial cells population in neurodegenerative diseases [42]. However, contrary to these pro-inflammatory effects, it was also suggested that P2Y<sub>2</sub>R can protect against LPS-induced cell death [43], reporting that its activation in microglial cells decreases the release of tumor necrosis factor and interleukin-6 and -12 release and nitric oxide induced by LPS [44]. Considering that neuro-inflammation induced by LPS leads to an accumulation of ubiquitin proteins in hippocampal neurons, an increased expression of E2 ubiquitin-conjugating enzyme UB2L6, a decrease in the proteasome activity and increases the immunoproteasome content [45], our results suggest that neuro-protective role attributed to P2Y<sub>2</sub>R in neuroinflammation conditions may be due to its capacity to increase UPS activity. According with this hypothesis we found that P2Y<sub>2</sub>R activation was able to revert both UPS-reporter accumulation and the cell death induced by a prolonged inhibition of UPS.

Finally, P2Y<sub>2</sub>R has also been associated with neurodegenerative diseases, especially in Alzheimer disease (AD) [46–48]. Therefore, it has been found that samples from postmortem neocortex of neuropathologically assessed AD human patients not only present a significant reduction in P2Y<sub>2</sub>R levels, but also this reduction correlates both with the reduction of neuropathologic scores and the loss of synaptic markers [46]. In addition, the deletion of P2Y<sub>2</sub>R accelerates the pathology onset in a mouse model of AD, leading to the premature death of these mice at 5 weeks of life [48]. Despite this evidence, the molecular mechanisms through which P2Y<sub>2</sub>R could be contributing to the AD pathology still remain unknown. Considering the solid evidences indicating that an UPS dysfunction represents one of the main molecular pathways that commonly underlie the pathogenesis of

different neurodegenerative diseases including AD [49], it would be reasonable to think that the downregulation of P2Y<sub>2</sub>R could contribute to the progression of AD promoting UPS impairment.

## 5. Conclusion

Summarizing, the results shown in the present work demonstrate that extracellular nucleotides are able to modulate the UPS activity in central nervous system cells through the purinergic P2Y<sub>2</sub> receptor. The underlying molecular mechanism entails the increased expression of catalytic proteasome subunits β1 and β5 by a mechanism dependent of PI3K/ERK1/2 activation. Considering that extracellular nucleotides are also able to increase the proteasome activity even when the cellular UPS activity was compromised, as occurs in neuropathological conditions such as neuroinflammation, oxidative stress and neurodegenerative diseases, this capacity may constitute the molecular mechanism underlying the neuroprotective role attributed to these compounds.

## Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in online version.

## Acknowledgements

We are grateful to Dr. Nico Dantuma (Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden) for providing Ub-M-GFP, Ub<sup>G76V</sup>-YFP and GFP-CL1 reporters. This work was

supported by funding from Spanish Ministry of Science and Education BFU2012-31195 to M.D.-H and SAF2015-65371-R to J.J.L. and from Universidad Complutense de Madrid (UCM)-Santander Central Hispano Bank 911585-670 to M.D.-H. A.S.-S are hired by BFU2012-31195 grant, L.D.G. has an UCM pre-doctoral fellowship supervised by M.D.-H., and M.R.-E. was an MSc student supervised by M.D.-H.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.10.012>.

## References

- [1] P. Bodin, G. Burnstock, Purinergic signalling: ATP release, *Neurochem. Res.* 26 (2001) 959–969.
- [2] G. Burnstock, Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 659–797.
- [3] G. Burnstock, B.B. Fredholm, A. Verkhratsky, Adenosine and ATP receptors in the brain, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) 973–1011.
- [4] M.P. Abbracchio, G. Burnstock, J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy, G.E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K.A. Jacobson, G.A. Weisman, International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 281–341.
- [5] H. Franke, P. Illes, Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS, *Pharmacol. Ther.* 109 (2006) 297–324.
- [6] G. Burnstock, A. Verkhratsky, Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death, *Cell Death Dis.* 1 (2010), e9.
- [7] J. Shen, C.I. Seye, M. Wang, G.A. Weisman, P.A. Wilden, M. Sturek, Cloning, up-regulation, and mitogenic role of porcine P2Y2 receptor in coronary artery smooth muscle cells, *Mol. Pharmacol.* 66 (2004) 1265–1274.
- [8] A.M. Schrader, J.M. Camden, G.A. Weisman, P2Y2 nucleotide receptor up-regulation in submandibular gland cells from the NOD.B10 mouse model of Sjögren's syndrome, *Arch. Oral Biol.* 50 (2005) 533–540.
- [9] A.E. Rodriguez-Zayas, A.I. Torrado, J.D. Miranda, P2Y2 receptor expression is altered in rats after spinal cord injury, *Int. J. Dev. Neurosci.* 28 (2010) 413–421.
- [10] G.A. Weisman, J.M. Camden, T.S. Peterson, D. Ajit, L.T. Woods, L. Erb, P2 receptors for extracellular nucleotides in the central nervous system: role of P2X7 and P2Y2(2) receptor interactions in neuroinflammation, *Mol. Neurobiol.* 46 (2012) 96–113.
- [11] N.E. Chorna, L.I. Santiago-Perez, L. Erb, C.I. Seye, J.T. Neary, G.Y. Sun, G.A. Weisman, F.A. Gonzalez, P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells, *J. Neurochem.* 91 (2004) 119–132.
- [12] S. Ahmad, A. Ahmad, M. Ghosh, C.C. Leslie, C.W. White, Extracellular ATP-mediated signaling for survival in hyperoxia-induced oxidative stress, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 16317–16325.
- [13] M. Burgos, J.T. Neary, F.A. Gonzalez, P2Y2 nucleotide receptors inhibit trauma-induced death of astrocytic cells, *J. Neurochem.* 103 (2007) 1785–1800.
- [14] P. Ballerini, P. Di Iorio, F. Caciagli, M.P. Rathbone, S. Jiang, E. Nargi, S. Buccella, P. Giuliani, I. D'Alimonte, G. Fischione, A. Masciulli, S. Romano, R. Ciccarelli, P2Y2 receptor up-regulation induced by guanosine or UTP in rat brain cultured astrocytes, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 19 (2006) 293–308.
- [15] Q. Kong, T.S. Peterson, O. Baker, E. Stanley, J. Camden, C.I. Seye, L. Erb, A. Simonyi, W.G. Wood, G.Y. Sun, G.A. Weisman, Interleukin-1 $\beta$  enhances nucleotide-induced and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing in rat primary cortical neurons via up-regulation of the P2Y2(2) receptor, *J. Neurochem.* 109 (2009) 1300–1310.
- [16] R.C. Choi, G.K. Chu, N.L. Siow, A.W. Yung, L.Y. Yung, P.S. Lee, C.C. Lo, J. Simon, T.T. Dong, E.A. Barnard, K.W. Tsing, Activation of UTP-sensitive P2Y2 receptor induces the expression of cholinergic genes in cultured cortical neurons: a signaling cascade triggered by Ca<sup>2+</sup> mobilization and extracellular regulated kinase phosphorylation, *Mol. Pharmacol.* 84 (2013) 50–61.
- [17] G.A. Weisman, D. Ajit, R. Garrad, T.S. Peterson, L.T. Woods, C. Thebeau, J.M. Camden, L. Erb, Neuroprotective roles of the P2Y2(2) receptor, *Purinergic Signal* 8 (2012) 559–578.
- [18] K. Lindsten, N.P. Dantuma, Monitoring the ubiquitin/proteasome system in conformational diseases, *Ageing Res. Rev.* 2 (2003) 433–449.
- [19] N.F. Bence, R.M. Sampat, R.R. Kopito, Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation, *Science* 292 (2001) 1552–1555.
- [20] S. Kaushik, A.M. Cuervo, Proteostasis and aging, *Nat. Med.* 21 (2015) 1406–1415.
- [21] A. Hershko, A. Ciechanover, The ubiquitin system, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 425–479.
- [22] A.L. Schwartz, A. Ciechanover, Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49 (2009) 73–96.
- [23] D. Vokes, P. Zwick, W. Baumeister, The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis, *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 1015–1068.
- [24] D. Vilchez, I. Morantte, Z. Liu, P.M. Douglas, C. Merkwirth, A.P. Rodrigues, G. Manning, A. Dillin, RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions, *Nature* 489 (2012) 263–268.
- [25] D. Vilchez, L. Boyer, I. Morantte, M. Lutz, C. Merkwirth, D. Joyce, B. Spencer, L. Page, E. Masliah, W.T. Berggren, F.H. Gage, A. Dillin, Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11, *Nature* 489 (2012) 304–308.
- [26] N.P. Dantuma, K. Lindsten, R. Glas, M. Jelline, M.G. Masucci, Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 538–543.
- [27] L. Homolya, W.C. Watt, E.R. Lazarowski, B.H. Koller, R.C. Boucher, Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y2(2) receptor (–/–) mice, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 26454–26460.
- [28] K. Lindsten, V. Menendez-Benito, M.G. Masucci, N.P. Dantuma, A transgenic mouse model of the ubiquitin/proteasome system, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 897–902.
- [29] M. Diaz-Hernandez, A.G. Valera, M.A. Moran, P. Gomez-Ramos, B. Alvarez-Castellano, J.G. Castano, F. Hernandez, J.J. Lucas, Inhibition of 26S proteasome activity by huntingtin filaments but not inclusion bodies isolated from mouse and human brain, *J. Neurochem.* 98 (2006) 1585–1596.
- [30] A.A. Ivanov, H. Ko, L. Cosyn, S. Maddileti, P. Besada, I. Fricks, S. Costanzi, T.K. Harden, S.V. Calenbergh, K.A. Jacobson, Molecular modeling of the human P2Y2 receptor and design of a selective agonist, 2'-amino-2'-deoxy-2'-thiouridine 5'-triphosphate, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 1166–1176.
- [31] B.R. Yerrxa, J.R. Sabater, C.W. Davis, M.J. Stutts, M. Lang-Furr, M. Picher, A.C. Jones, M. Cowlen, R. Dougherty, J. Boyer, W.M. Abraham, R.C. Boucher, Pharmacology of INS37217 [P(1)-(uridine 5')-P(4)-(2'-deoxycytidine 5')tetraphosphate, tetrasodium salt], a next-generation P2Y2(2) receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302 (2002) 871–880.
- [32] K.A. Jacobson, S. Costanzi, A.A. Ivanov, S. Tchilibon, P. Besada, Z.G. Gao, S. Maddileti, T.K. Harden, Structure activity and molecular modeling analyses of ribose- and base-modified uridine 5'-triphosphate analogues at the human P2Y2 and P2Y4 receptors, *Biochem. Pharmacol.* 71 (2006) 540–549.
- [33] P.M. Kloetzel, Antigen processing by the proteasome, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 179–187.
- [34] K.L. Rock, I.A. York, T. Saric, A.L. Goldberg, Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides, *Adv. Immunol.* 80 (2002) 1–70.
- [35] Y. Pankratov, U. Lalo, A. Verkhratsky, R.A. North, Vesicular release of ATP at central synapses, *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* 452 (2006) 589–597.
- [36] D.B. Arthur, S. Georgi, K. Akassoglou, P.A. Insel, Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival, *J. Neurosci.* 26 (2006) 3798–3804.
- [37] J. Liu, Z. Liao, J. Camden, K.D. Griffin, R.C. Garrad, L.I. Santiago-Perez, F.A. Gonzalez, C.I. Seye, G.A. Weisman, L. Erb, Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 8212–8218.
- [38] R. Roskoski Jr., ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation, *Pharmacol. Res.* 66 (2012) 105–143.
- [39] N.P. Dantuma, K. Lindsten, Stressing the ubiquitin-proteasome system, *Cardiovasc. Res.* 85 (2010) 263–271.
- [40] N. Chondrogianni, C. Tzavelas, A.J. Pemberton, I.P. Nezis, A.J. Rivett, E.S. Gonos, Overexpression of proteasome beta5 assemblase subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 11840–11850.
- [41] S.Y. Eun, J. Seo, S.W. Park, J.H. Lee, K.C. Chang, H.J. Kim, LPS potentiates nucleotide-induced inflammatory gene expression in macrophages via the upregulation of P2Y2 receptor, *Int. Immunopharmacol.* 18 (2014) 270–276.
- [42] F. Kukulski, F. Ben Yebdi, F. Bahrami, M. Fausther, A. Tremblay, J. Sevigny, Endothelial P2Y2 receptor regulates LPS-induced neutrophil transendothelial migration in vitro, *Mol. Immunol.* 47 (2010) 991–999.
- [43] A.N. Guerra, P.L. Fiset, Z.A. Pfeiffer, B.H. Quinchia-Rios, U. Prabhu, M. Aga, L.C. Denlinger, A.G. Guadarrama, S. Abozeid, J.A. Sommer, R.A. Proctor, P.J. Bertics, Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology, *J. Endotoxin Res.* 9 (2003) 256–263.
- [44] A.A. Boucher, J.C. Arnold, G.E. Hunt, A. Spiro, J. Spencer, C. Brown, I.S. McGregor, M.R. Bennett, M. Kassiou, Resilience and reduced c-Fos expression in P2X7 receptor knockout mice exposed to repeated forced swim test, *Neuroscience* 189 (2011) 170–177.
- [45] C. Pintado, M.P. Gavilan, E. Gavilan, L. Garcia-Cuervo, A. Gutierrez, J. Vitorica, A. Castano, R.M. Rios, D. Ruano, Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation leads to the accumulation of ubiquitinated proteins and increases susceptibility to neurodegeneration induced by proteasome inhibition in rat hippocampus, *J. Neuroinflammation* 9 (2012) 87.
- [46] M.K. Lai, M.G. Tan, S. Kirvell, C. Hobbs, J. Lee, M.M. Esiri, C.P. Chen, P.T. Francis, Selective loss of P2Y2 nucleotide receptor immunoreactivity is associated with Alzheimer's disease neuropathology, *J. Neural. Transm. (Vienna)* 115 (2008) 1165–1172.
- [47] M. Leon-Otegui, R. Gomez-Villafuertes, J.I. Diaz-Hernandez, M. Diaz-Hernandez, M.T. Miras-Portugal, J. Gualix, Opposite effects of P2X7 and P2Y2 nucleotide receptors on alpha-secretase-dependent APP processing in Neuro-2a cells, *FEBS Lett.* 585 (2011) 2255–2262.
- [48] D. Ajit, L.T. Woods, J.M. Camden, C.N. Thebeau, F.G. El-Sayed, G.W. Greeson, L. Erb, M.J. Petris, D.C. Miller, G.Y. Sun, G.A. Weisman, Loss of P2Y2(2) nucleotide receptors enhances early pathology in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease, *Mol. Neurobiol.* 49 (2014) 1031–1042.
- [49] K. Gadhave, N. Bolshette, A. Ahire, R. Pardeshi, K. Thakur, C. Trandafir, A. Istrate, S. Ahmed, M. Lahkar, D.F. Muresanu, M. Balea, The ubiquitin proteasomal system: a potential target for the management of Alzheimer's disease, *J. Cell. Mol. Med.* (2016).